

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 4 月 18 日 (18.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/31154 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/29, 5/14, (72) 発明者; および
C07K 14/415, A01H 5/00 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高岩文雄
(TAKAIWA, Fumio) [JP/JP]; 〒300-0845 茨城県土
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08936 浦市乙戸南3丁目21-28 Ibaraki (JP). 小野寺康之
(ONODERA, Yasuyuki) [JP/JP]; 〒184-0013 東京都小
(22) 国際出願日: 2001 年 10 月 11 日 (11.10.2001) 金井市前原町3-4-17 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
(26) 国際公開の言語: 日本語 Ibaraki (JP).
- (30) 優先権データ: (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, IN, KR, US.
特願 2000-311295
2000 年 10 月 11 日 (11.10.2000) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (CH, DE, ES, FR, GB,
IT).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人 農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTI-
TUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP];
〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 Ibaraki (JP).
生物系特定産業技術研究推進機構 (BIO-ORIENTED
TECHNOLOGY RESEARCH ADVANCEMENT IN-
STITUTION) [JP/JP]; 〒331-8537 埼玉県さいたま市
日進町1丁目40-2 Saitama (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BZIP TYPE TRANSCRIPTON FACTORS REGULATING THE EXPRESSION OF RICE STORAGE PROTEIN

(54) 発明の名称: イネ貯蔵タンパク質の発現を制御するbZIP型転写因子

(57) Abstract: cDNAs (RISBZ1, RISBZ4 and RISBZ5) encoding bZIP type transcriptional factors are isolated from a rice seed-origin cDNA library. These cDNAs encode novel proteins and show binding activity to the GCN4 motif. RISBZ1 activates the transcription 100-fold or higher via the GCN4 motif. The expression of RISBZ1 precedes the expression of a seed storage protein gene and observed exclusively in seeds in the ripening stage, which suggests that RISBZ1 regulates the expression of the rice seed storage protein. To facilitate the binding to the RISBZ1 transcription factor, the recognition sequence (GGN4 motif) of the transcription factor is ligated in series and transferred into a promoter of a specific storage protein. Thus, the expression of a foreign gene under the regulation of the thus modified promoter can be elevated.

[続葉有]

WO 02/31154 A1



(57) 要約:

イネ種子由来の cDNA ライブラリーより、bZIP 型転写因子をコードする cDNA(RISBZ1、RISBZ4、RISBZ5)を単離した。該 cDNA は新規なタンパク質をコードしており、GCN4 モチーフに対して結合活性を有していた。また RISBZ1 は、GCN4 モチーフを介して転写を 100 倍以上活性化させた。さらに RISBZ1 の発現は、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現より先行し、登熟期の種子のみで発現していることから、RISBZ1 はイネ種子貯蔵タンパク質の発現を制御していることが示唆された。また、RISBZ1 転写因子との結合を容易にするため、転写因子の認識配列(GCN4 モチーフ)を直列状に連結し、ある種の貯蔵タンパク質のプロモーターに導入することにより、この改変したプロモーターの制御下に位置する外来遺伝子の発現を高めることができた。

明細書

イネ貯蔵タンパク質の発現を制御する bZIP 型転写因子

技術分野

本発明は、イネ種子貯蔵タンパク質の胚乳特異的発現に関わる新規転写因子、およびその利用に関する。

背景技術

種子貯蔵タンパク質は、登熟期の種子のみで発現するタンパク質であり、それをコードする遺伝子の発現解析は、植物遺伝子の転写調節機構を調べる上で格好のモデルである (Goldberg, R.B. et al. Science 266: 605-614, 1994)。種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の発現調節は、プロモーター中の複数のシス因子が協調的に働くことによって行われることが知られている。転写因子の特定のシス調節因子への結合は、転写開始および組織・時期特異的発現における重要な構成要素となっている。種子貯蔵タンパク質の発現には、種子特異的な発現調節に関わる数種のシス調節因子が関与し、それぞれのシス調節因子を認識する転写因子が、結合ならびに集合することによって引き起こされるものと説明することができる。それゆえ、種子貯蔵タンパク質の発現の分子機構を理解するために、作物の貯蔵タンパク質遺伝子のシス調節因子、および転写因子の機能解析が行われてきた (Thomas T. L. Plant Cell 5:1401-1410, 1993; Morton R. L. et al. In Seed Development and Germination pp. 103-138, Marcel Dekker, Inc., 1995)。

しかしながら多くの研究にも拘らず、ほとんどの作物において、同種の形質転換植物を用いた解析では、遺伝子調節に不可欠シス調節因子を同定できておらず、いまだ遺伝子調節機構は明確には理解されていない。特に単子葉植物では、安定

した同種の形質転換植物を用いたプロモーター解析が行われているのは、イネの種子貯蔵タンパク質グルテリンに限られている。一方、トウモロコシ、コムギおよびオオムギでは、粒子銃あるいはタバコ形質転換体を用いた解析が行われている(Muller M. and Knudsen S. *Plant J.* 6: 343-355, 1993; Albani D et al. *Plant Cell* 9: 171-184, 1997; Marzabal P. M. et al. *Plant J.* 16: 41-52, 1998)。

穀物の種子貯蔵タンパク質遺伝子の胚乳特異的発現は、数種のシス調節因子が協調的に働くことによって、制御されていることが示されている。多くの穀物の種子貯蔵タンパク質遺伝子プロモーターで保存されている Prolamin box (TGTAAG), GCN4 モチーフ (TGA(G/C)TCA), AACA モチーフ(AACAAAA)および ACGT モチーフは、loss-of-function (機能欠損) および gain-of-function (機能獲得) 解析によって、胚乳特異的発現に関わるシス調節因子として特徴付けされた(Morton R. L. et al. *In Seed Development and Germination* pp. 103-138, Marcel Dekker, Inc., 1995)。

GCN4 モチーフは種子貯蔵タンパク質遺伝子ばかりではなく、代謝に関わる遺伝子のプロモーターからも多く見出されている(Muller M. and Knudsen S. *Plant J.* 6: 343-355, 1993)。最近、イネグルテリン遺伝子の GCN4 モチーフの多量体が、形質転換イネにおいて胚乳特異的発現を再現し、また GCN4 モチーフの塩基置換や欠失によってプロモーター活性の著しい低下、発現パターンの変化が見出されたことから、GCN4 モチーフが胚乳特異的発現に重要な役割を担っていることが証明された(Wu C. Y. et al. *Plant J.* 14: 673-683, 1998)。GCN4 モチーフはしばしば数塩基を挟んで Prolamin box (TGTAAG)と連鎖しており、コムギのグルテニン、オオムギのホールデン、ライムギのセカリン、ソルガムのカフリン、ハトムギの coixin などほとんど全ての穀物のプロラミン遺伝子プロモーターに見出される 2 因子性 endosperm box の構成要素の一つとなっている。ほとんどのイネグルテリン遺伝子は、AACA モチーフが関与している。2 つのモチ

ーフの組み合わせ (GCN4 モチーフと Prolamin box、もしくは GCN4 モチーフと AACAA モチーフ) が必要であるが、胚乳特異的プロモーターとして十分に機能するためには、さらにモチーフが必須である (Takaiwa F. et al. Plant Mol. Biol. 30: 1207-1221, 1996; Yoshihara T. et al. FEBS Letts. 383: 213-218, 1996; Wu C. Y. et al. Plant J. (in press))。最近、イネグルテリン遺伝子 (GluB1) において、胚乳特異的発現を再現できる最小プロモーターとして機能するためには、-197bp プロモーター領域に見出される GCN4 モチーフ、AACAA モチーフおよび ACGT モチーフの中の少なくとも 3 つが必須であることが示された (Wu C. Y. et al. Plant J. 14: 673-683, 1998; Wu C. Y. et al. Plant J. 23: 415-421, 2000)。

トウモロコシの Opaque2(O2) は bZIP 型の胚乳特異的転写因子であり、この O2 はトウモロコシ 22kDa α -ゼイン遺伝子プロモーター中の ACGT モチーフと結合し、転写を活性化させる (Schmidt R. J. et al. Plant Cell 4: 689-700, 1992)。O2 は (Ga/tTGAPyPuTGpu) 配列と結合して、b-32 リボソーム不活化タンパク質遺伝子の胚乳特異的転写に関与していることも報告されていることから (Lohmer S. et al. EMBO J. 10: 617-624, 1991)、O2 は幅広い結合能を有するものと考えられる。GCN4 モチーフは O2 によって認識され、O2 との結合を介して転写が活性化されることが報告されている (Wu C. Y. et al. Plant J. 14: 673-683, 1998; Holdsworth M. J. et al. Plant Mol. Biol. 29: 711-720, 1995)。登熟期の種子では、核タンパク質が、コムギの低分子量グルテニン遺伝子 (Vicente-Carbajos J. et al. Plant J. 13: 629-640, 1998) プロモーターおよびトウモロコシ γ -ゼイン遺伝子プロモーター (Marzabal P. M. et al. Plant J. 16: 41-52, 1998) 中に存在する GCN4 モチーフ、および Prolamin box と結合していることが、in vivo footprint 解析により示された。また、in vitro DNaseI footprint 解析により、イネ登熟期種子の核タンパク質および GST-O2 融合タンパク質が、イネグルテリン遺伝子プロモーターの GCN4 モチーフを特異的に認識

していることが示された(Wu C. Y. et al. Plant J. 14: 673-683, 1998; Kim S. Y. and Wu R. Nucl. Acids Res. 18: 6845-6852, 1990)。これらの知見から、穀物の種子には O2 様転写因子が存在し、GCN4 モチーフを介して多くの種子貯蔵タンパク質遺伝子の胚乳特異的発現を制御しているものと考えられる。

最近、GCN4 モチーフを認識する転写因子の cDNA クローンが、コムギ(Albani D et al. Plant Cell 9: 171-184, 1997)およびオオムギ(Vicente-Carbajos J et al. Plant J. 13: 629-640, 1998; Onate L. et al. J. Biol. Chem. 274: 9175-9182, 1999)において単離され、SPA、BLZ1 および BLZ2 と名付けられた。これらの転写因子は、コムギの低分子量グルテニン、およびオオムギ B1 ホールデン遺伝子プロモーター中の GCN4 モチーフを介して、種子貯蔵タンパク質遺伝子の転写を活性化させることが分かった。興味深いことにこれらの転写因子は、種子特異的に発現していた。O2 の bZIP ドメインと高い相同性を示す転写因子をコードする cDNA は、これまでにイネから単離されてはいるものの、GCN4 モチーフを介して種子貯蔵タンパク質遺伝子の転写を活性化させるか否かは確かめられていない(Izawa T. et al. Plant Cell 6: 1277-1287, 1994; Nakase M. et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-522, 1997)。

発明の開示

本発明は GCN4 モチーフとの結合を介してイネ種子貯蔵タンパク質の発現を制御する新規転写因子、およびそれをコードする遺伝子、並びに該遺伝子が導入された植物細胞および植物体、並びにそれらの製造および用途の提供を課題とする。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行った。上述したように GCN4 モチーフは、穀物の種子貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーターで高度に保存されている配列であり、当該遺伝子の胚乳特異的発現において中心的な役割を担っている。この GCN4 モチーフは、トウモロコシの Opaque2(O2)タンパク質と近縁な bZIP 型転写因子群の認識配列である。そこで、本発明者らは、bZIP 型転

写因子をイネ種子から単離することにより、GCN4 モチーフとの結合を介してイネ種子貯蔵タンパク質の発現を制御する転写因子を同定できるものと考えた。

まず本発明者らは、イネ種子由来の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、5 種類の bZIP 型転写因子をコードする cDNA (RISBZ1, RISBZ2, RISBZ3, RISBZ4, RISBZ5) を単離した。推定されるアミノ酸配列の相同性から、RISBZ2 および RISBZ3 は、既知の RITA1 (Izawa T. et al. Plant Cell 6: 1277-1287, 1994) および REB (Nakase M. et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-522, 1997) と同一なものであったが、残りの RISBZ1、RISBZ4、RISBZ5 は新規なタンパク質をコードしていることが判明した。上記 5 種のタンパク質について、GCN4 モチーフとの結合能を調べたところ、RISBZ1, RISBZ2, RISBZ3, RISBZ4, RISBZ5 のいずれも、GCN4 モチーフとの結合活性を有することが判明した。次に 5 種のタンパク質について、GCN4 モチーフとの結合を介した転写活性化能を調べる実験を行った。その結果、RISBZ1 だけが GCN4 モチーフとの結合を介して転写を 100 倍以上活性化させることが判明した。また、酵母の GAL4 DNA 結合ドメインを用いた解析により、RISBZ1 のプロリンに富んだ N 末端側の 27 アミノ酸残基が、転写活性化ドメインとして機能していることが判明した。RISBZ1 とその他の RISBZ との転写活性化能の違いは、7 アミノ酸残基の変異 (RISBZ2)、あるいは転写活性化ドメイン (RISBZ3, RISBZ4, RISBZ5) の欠失に主として起因するものだった。このことから、転写活性化ドメインの構造変異によって、RISBZ1 と他の RISBZ タンパク質との転写活性化能の差異が生じることが示唆された。また、RISBZ1 はホモダイマーばかりでなく、他の RISBZ タンパク質とヘテロダイマーも形成することが判明した。さらに RISBZ1 の発現は、種子貯蔵タンパク質遺伝子の発現より先行し、登熟期の種子のみで発現していることから、RISBZ1 は種子貯蔵タンパク質の発現を制御している可能性が示唆された。次に RISBZ1 遺伝子の発現を調べるために、該遺伝子のプロモーターが連結された GUS レポーター遺伝子を導入したイネを作出した。このイネの GUS 遺伝子の発現は糊粉層において強く発現し

ていた。

以上のように本発明者らは、新規タンパク質 RISBZ1、RISBZ4、RISBZ5 が、実際に GCN4 モチーフと結合することを示し、さらに RISBZ1 がイネ種子貯蔵タンパク質遺伝子の胚乳特異的発現に関わる転写活性化因子であることを明らかにした。

また本発明者らは、本発明の RISBZ1 をプロモーターの下流に結合させた DNA 構築物、および RISBZ1 の標的配列を含むプロモーターの下流にレポーター遺伝子を結合させた DNA 構築物を含む形質転換植物体を作成した。そして該形質転換植物体を用いることにより、レポーター遺伝子の発現を指標とした、RISBZ1 の転写活性の測定に成功した。このことから、有用な高度付加価値のある外来遺伝子を、上記レポーター遺伝子の代わりに RISBZ1 の標的配列を含むプロモーターの下流に結合させることによって、形質転換植物体細胞内で高度に発現させることが可能となった。

すなわち本発明は、GCN4 モチーフとの結合を介してイネ種子貯蔵タンパク質の発現を調節する新規転写因子、およびそれをコードする遺伝子、並びに該遺伝子が導入された植物細胞および植物体、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

〔1〕 下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：2、5、または7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(b) 配列番号：1、3、4、または6のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA、

(c) 配列番号：2、5、または7のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2、5、または7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA、

(d) 配列番号：1、3、4、または6のいずれかに記載の塩基配列からなる

7

DNA とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズし、配列番号：2、5、または7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA、

〔2〕 GCN4 モチーフと結合する機能、またはイネ種子貯蔵タンパク質の発現を活性化する機能を有するタンパク質をコードする、〔1〕に記載の DNA、

〔3〕 イネ由来である、〔1〕または〔2〕に記載の DNA、

〔4〕 〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の DNA の転写産物と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA、

〔5〕 〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の DNA の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA、

〔6〕 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の DNA の発現を抑制させる RNA をコードし、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の DNA と 90%以上の相同性を有する DNA、

〔7〕 植物細胞における内在性の〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の DNA がコードするタンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するタンパク質をコードする DNA、

〔8〕 〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の DNA を含むベクター、

〔9〕 〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の DNA または〔8〕に記載のベクターを保持する形質転換細胞、

〔10〕 〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の DNA によりコードされるタンパク質、

〔11〕 〔9〕に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、〔10〕に記載のタンパク質の製造方法、

〔12〕 〔4〕から〔7〕のいずれかに記載の DNA を含むベクター、

〔13〕 〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の DNA または〔8〕若しくは〔1

- 2〕に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞、
- 〔14〕 〔13〕に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、
- 〔15〕 〔14〕に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体、
- 〔16〕 〔14〕または〔15〕に記載の形質転換植物体の繁殖材料、
- 〔17〕 〔10〕に記載のタンパク質に結合する抗体、
- 〔18〕 発現制御領域の下流に〔1〕に記載の DNA が機能的に結合した DNA 構築物、および〔10〕に記載のタンパク質の標的配列を有する発現制御領域の下流に外来遺伝子が機能的に結合した DNA 構築物をゲノム上に有する植物体、
- 〔19〕 標的配列が GCN4 モチーフを含む配列である〔18〕に記載の植物体、
- 〔20〕 GCN4 モチーフが配列番号：8、13、または14のいずれかに記載の配列である〔19〕に記載の植物体、
- 〔21〕 標的配列が G/C ボックスを含む配列である〔18〕に記載の植物体、
- 〔22〕 発現制御領域の下流に〔1〕に記載の DNA が機能的に結合した DNA 構築物をゲノム上に有する植物体、および〔10〕に記載のタンパク質の標的配列を含む発現制御領域の下流に外来遺伝子が機能的に結合した DNA 構築物をゲノム上に有する植物体を交配させることを特徴とする、〔18〕から〔21〕のいずれかに記載の植物体の作出方法、を提供するものである。

本発明は、イネ由来の RISBZ1、RISBZ4、および RISBZ5 タンパク質をコードする DNA を提供する。RISBZ1 の cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、該 cDNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2 に、ゲノム DNA の塩基配列を配列番号：3 に示す（配列番号：3 に記載のゲノム DNA は、イントロンを含む、6つのエキソンからなる）。また、RISBZ4 および RISBZ5 タンパク質の cDNA の塩基配列をそれぞれ配列番号：4 および 6 に、RISBZ4 および RISBZ5 タンパク質の cDNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：5 および 7 に示す。なお、本明細書において、本発明の RISBZ1、RISBZ4、RISBZ5 をまと

めて、RISBZ と表記する。

本発明の RISBZ タンパク質は、GCN4 モチーフと結合する能力を有し、bZIP 型の転写因子であると考えられる。その中でも、RISBZ1 は、GCN4 モチーフとの結合を介して転写を顕著に活性化する能力を有していた。RISBZ1 遺伝子のプロモーターがイネ種子の糊粉層において活性化していたことから、RISBZ1 は、イネ種子貯蔵タンパク質の発現を制御する転写活性化因子であると考えられる。

また、bZIP 型転写因子はファミリーに属する様々な因子の組み合わせにより、多様なホモ／ヘテロ二量体を形成する。その結果、様々な機能を備えた制御因子が形成され、それらが遺伝子の転写を制御していることが報告されている。下記の実施例において、RISBZ2 および RISBZ3 が RISBZ1 とヘテロ二量体を形成することを示した。また、RISBZ4 および RISBZ5 は RISBZ3 の bZIP ドメインと相溶性が非常に高く（96%および 82.7%）、これらの因子も RISBZ1 とヘテロ二量体を形成する可能性が考えられる。これらの事実から、本発明の RISBZ4 および RISBZ5 は、登熟ステージおよび組織に応じて、本発明の RISBZ1 および他の RISBZ メンバーとヘテロ二量体を形成し、様々な転写活性化能や DNA 結合特性を備えた因子を形成することによって種子貯蔵タンパク質の発現を制御することが十分に考えられる。

従って、本発明の RISBZ タンパク質をコードする DNA、あるいは該 DNA の発現を制御する分子は、例えば、種子貯蔵タンパク質の発現を調節することに利用することが考えられる。種子貯蔵タンパク質の発現の調節は、産業上様々な利点を有する。例えば、胚乳中の種子貯蔵タンパク質を欠損させることにより、外来遺伝子産物を胚乳中に高度に集積させることが可能となる。一方、胚乳中に種子貯蔵タンパク質を高度に蓄積させることにより、より栄養価を高めた種子（例えば、コメ）を生産することが可能となる。

本発明の RISBZ タンパク質をコードする DNA には、ゲノム DNA、cDNA、および化学合成 DNA が含まれる。ゲノム DNA および cDNA の調製は、当業者にとって常

套手段を利用して行うことが可能である。ゲノム DNA は、例えば、植物細胞または組織からゲノム DNA を抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PAC などが利用できる）を作成し、これを展開して、本発明タンパク質をコードする DNA（例えば、配列番号：1、3、4、6）を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、本発明タンパク質をコードする DNA（例えば、配列番号：1、3、4、6）に特異的なプライマーを作成し、これを利用した PCR を行うことによって調製することも可能である。また、cDNA は、例えば、植物細胞または組織から抽出した mRNA を基に cDNA を合成し、これを λZAP 等のベクターに挿入して cDNA ライブラリーを作成し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCR を行うことにより調製することが可能である。

本発明は、配列番号：2、5、7に記載の RISBZ タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を包含する。ここで「RISBZ タンパク質と機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が配列番号：2、5、7に記載の RISBZ タンパク質と同等の生物学的機能、例えば、GCN4 モチーフと結合する機能、および/またはイネ種子貯蔵タンパク質の発現を調節する機能を有することを指す。イネ貯蔵タンパク質としては、例えばイネグルテリンを挙げることができる。

このような DNA には、例えば、配列番号：2、5、7に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする変異体、誘導体、アレル、バリエーションおよびホモログが含まれる。

アミノ酸配列が改変されたタンパク質をコードする DNA を調製するための当業者によく知られた方法としては、例えば、site-directed mutagenesis 法 (Kramer, W.& Fritz,H.-J. (1987) Oligonucleotide-directed construction

of mutagenesis via gapped duplex DNA. Methods in Enzymology, 154: 350-367) が挙げられる。また、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは、自然界においても生じ得る。このように天然型の RISBZ タンパク質（配列番号：2、5、7）をコードするアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA であっても、天然型の RISBZ タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードする限り、本発明の DNA に含まれる。また、たとえば、塩基配列が変異した場合でも、それがタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合（縮重変異）もあり、このような縮重変異体も本発明の DNA に含まれる。対象となる DNA の塩基の変異数は、アミノ酸レベルにおいて、典型的には、100 アミノ酸以内、好ましくは 50 アミノ酸以内、さらに好ましくは 20 アミノ酸以内、さらに好ましくは 10 アミノ酸以内（例えば、5 アミノ酸以内、3 アミノ酸以内）である。

ある DNA が GCN4 モチーフに結合する機能を有するタンパク質をコードするか否かは、例えば当業者により一般的に行われているゲルシフトアッセイによって調べることができる。具体的には、次のような方法で行うことができる。まず被検 DNA を、その遺伝子産物が GST との融合タンパク質を生成するようにベクターへ組み込み、該ベクターからの融合タンパク質を発現させる。発現産物を GST を指標に精製し、GCN4 モチーフを含む標識した DNA プローブと混合する。この混合液を、非変性アクリルアミドゲルを用いた電気泳動により解析を行う。検出されたゲル上のバンドの位置から、結合活性を評価することができる。

また、ある DNA がイネ種子貯蔵タンパク質の発現を活性化する機能を有するタンパク質をコードするか否かは、例えばレポーターアッセイにより調べることができる。具体的には、次のような方法で行うことができる。まず、イネ種子貯蔵タンパク質のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結させたベクターを構築する。該ベクターと、被検 DNA の遺伝子産物を発現するベクターとをレポータ

12

ーアッセイ用の細胞へ導入し、レポーター遺伝子産物の活性を測定することにより、被検 DNA 遺伝子産物の転写活性の評価を行う。該レポーターアッセイに使用することができるイネ種子貯蔵タンパク質のプロモーターとしては、例えばイネグルテリン遺伝子プロモーターを挙げることができる。レポーター遺伝子としては、その発現を検出し得るものであれば特に制限はなく、当業者が一般的に各種アッセイ系に使用するレポーター遺伝子を用いることができる。好適なレポーター遺伝子としては、例えば、 β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子を挙げることができる。

配列番号：2、5、7に記載の RISBZ タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を調製するために、当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Southern, E.M. (1975) *Journal of Molecular Biology*, 98, 503) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, R. K. et al. (1985) *Science*, 230, 1350-1354、Saiki, R. K. et al. (1988) *Science*, 239, 487-491) を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者にとっては、RISBZ 遺伝子 (配列番号：1、3、4、6) もしくはその一部をプローブとして、また該遺伝子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、イネなどから RISBZ 遺伝子と高い相同性を有する DNA を単離することは通常行いうることである。このようにハイブリダイズ技術や PCR 技術により単離しうる RISBZ タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードする DNA もまた本発明の DNA に含まれる。

このような DNA を単離するためには、好ましくはストリンジেন্টな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明においてストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件とは、6M 尿素、0.4% SDS、0.5x SSC の条件またはこれと同等のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。よりストリンジエンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4% SDS、0.1x SSC の条件を用れば、より相同性の高い DNA の効率的な単離を期待することができる。これにより単離

された DNA は、アミノ酸レベルにおいて、RISBZ タンパク質のアミノ酸配列（配列番号：2、5、7）と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で、少なくとも 50% 以上、さらに好ましくは 70% 以上、さらに好ましくは 90% 以上（例えば、95% 以上）の配列の同一性を指す。配列の同一性は、FASTA 検索（Pearson W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:2444-2448）や BLAST 検索により決定することができる。

本発明の DNA は、例えば、組み換えタンパク質の調製や上述したように、トランスジェニック植物の作出に利用することが可能である。

組み換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のタンパク質をコードする DNA を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。組み換えタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることも可能である。例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法（米国 New England Biolabs 社発売のベクター pMAL シリーズ）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として調製する方法（Amersham Pharmacia Biotech 社発売のベクター pGEX シリーズ）、ヒスチジンタグを付加して調製する方法（Novagen 社の pET シリーズ）などを利用することが可能である。宿主細胞としては、組み換えタンパク質の発現に適した細胞であれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法（Mandel, M. & Higa, A. (1970) Journal of Molecular Biology, 53, 158-162、Hanahan, D. (1983) Journal of Molecular Biology, 166, 557-580）を用いることができる。宿主細胞内で発現させた組み換えタンパク質は、該宿主細胞またはその培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することが可能である。組み

換えタンパク質を上記したマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現させた場合には、容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。

得られた組換えタンパク質を用いれば、これに結合する抗体を調製することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、精製した本発明のタンパク質若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血べいを除去することにより調製することが可能である。また、モノクローナル抗体は、上記タンパク質若しくはペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単一クローンの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の精製や検出などに利用することが可能である。本発明には、本発明のタンパク質に結合する抗体が含まれる。

本発明の DNA を発現する形質転換植物体を作製する場合には、本発明のタンパク質をコードする DNA を適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。

一方、本発明の DNA の発現が抑制された形質転換植物体を作製する場合には、本発明のタンパク質をコードする DNA の発現を抑制するための DNA を適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。「本発明のタンパク質をコードする DNA の発現の抑制」には、遺伝子の転写の抑制およびタンパク質への翻訳の抑制が含まれる。また、DNA の発現の完全な停止のみならず発現の減少も含まれる。

植物における特定の内在性遺伝子の発現を抑制する方法としては、アンチセンス技術を利用する方法が当業者に最もよく利用されている。植物細胞におけるアンチセンス効果は、エッカーらが一時的遺伝子発現法を用いて、電気穿孔法で導入したアンチセンス RNA が植物においてアンチセンス効果を発揮することで初めて実証した(J.R.Ecker および R.W.Davis, (1986) Proc.Natl.Acad.USA.83:5372)。

その後、タバコやベチュニアにおいても、アンチセンス RNA の発現によって標的遺伝子の発現を低下させる例が報告されており(A.R.van der Krol ら (1988) Nature 333:866)、現在では植物における遺伝子発現を抑制させる手段として確立している。

アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造が作られた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNA の翻訳領域やポリリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座 2 核酸 IV 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp.319-347, 1993)。

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子の mRNA の 5' 端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは 3' 側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む DNA も、本発明で利用されるアンチセンス DNA に含まれる。使用されるアンチセンス DNA は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは

3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製されたDNAは、公知の方法で、所望の植物へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換する植物が持つ内在性遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくともよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。配列の相補性は、上記した検索により決定することができる。

アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスDNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるMIRNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191)。

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている(M.Koizumiら, (1988) FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である(M.Koizumiら, (1988) FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄

子,(1990) 蛋白質核酸酵素,35:2191、 M.Koizumi ら, (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7059)。例えば、RISBZ 遺伝子 (配列番号: 1、3、4、6) のコード領域中には標的となりうる部位が複数存在する。

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライト RNA のマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan *Nature* 323:349,1986)。このリボザイムも、標的特異的な RNA 切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi および N.Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19:6751、 菊池洋, (1992) 化学と生物 30:112)。

標的を切断できるよう設計されたりボザイムは、植物細胞中で転写されるようになりフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターなどのプロモーターおよび転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写された RNA の 5' 末端や 3' 末端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われてしまうことがある。このようなとき、転写されたりボザイムを含む RNA からリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の 5' 側や 3' 側に、トリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である (K.Taira ら, (1990) *Protein Eng.* 3:733、 A.M.Dzianott および J.J.Bujarski (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 86:4823、 C.A.Grosshans および R.T.Cech (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3875、 K.Taira ら (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:5125)。また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる (N.Yuyama ら *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 186:1271,1992)。このようなりボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する DNA の形質転換によってもたらされる共抑制によっても達成され

うる。「共抑制」とは、植物に標的内在性遺伝子と同一若しくは類似した配列を有する遺伝子を形質転換により導入すると、導入する外来遺伝子および標的内在性遺伝子の両方の発現が抑制される現象のことをいう。共抑制の機構の詳細は明らかではないが、植物においてはしばしば観察される(Curr. Biol. 7:R793, 1997; Curr. Biol. 6:810, 1996)。例えば、RISBZ 遺伝子が共抑制された植物体を得るためには、RISBZ 遺伝子若しくはこれと類似した配列を有する DNA を発現できるように作製したベクターDNA を目的の植物へ形質転換し、得られた植物体から RISBZ 変異体の形質を有する植物、例えば、種子における貯蔵タンパク質の発現量が改変された植物を選択すればよい。共抑制に用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも 70%以上、好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上（例えば、95%以上）の配列の同一性を有する。配列の同一性は、上記した検索を利用して決定することができる。

さらに、本発明における内在性遺伝子の発現の抑制は、標的遺伝子のドミナントネガティブの形質を有する遺伝子を植物へ形質転換することによっても達成することができる。本発明において「ドミナントネガティブの形質を有するタンパク質をコードする DNA」とは、該 DNA を発現させることによって、植物体が本来持つ本発明の内在性遺伝子がコードするタンパク質の活性を消失もしくは低下させる機能を有するタンパク質をコードする DNA のことを指す。例えば、本発明のタンパク質の転写活性化ドメインが欠失し、GCN4 結合能を有するペプチド（例えば、配列番号: 2 のアミノ酸配列の 1 位から 40 位を欠失したペプチドまたはこれに対応する他のタンパク質のペプチド）をコードする DNA である。

植物細胞の形質転換に用いられるベクターとしては、該細胞内で挿入遺伝子を発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、植物細胞内での恒常的な遺伝子発現を行うためのプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター）を有するベクターや外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることも可能である。また、組

組織特異的な発現を保証するプロモーターを好適に用いることもできる。組織特異的なプロモーターとしては、例えば、イネの種子において発現させる場合にはグルテリン遺伝子のプロモーター (Takaiwa, F. et al., *Plant Mol. Biol.*, 17, 875-885, 1991) や本発明の RISBZ1 のプロモーターが、インゲンマメ、ソラマメ、エンドウなどの豆科作物やピーナツ、ゴマ、ナタネ、綿実、ヒマワリ、サフラワーなどの油糧用種子作物の種子において発現させる場合には、グリシニン遺伝子のプロモーターあるいは各作物の主要な貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーター、例えば、インゲンマメであればファゼオリン遺伝子のプロモーター (Murai, N. et al., *Science*, 222, 476-482, 1983) が、ナタネであればクルシフェリン遺伝子のプロモーター (Rodin, J. et al., *Plant Mol. Biol.*, 20, 559-563, 1992) が挙げられる。また、ジャガイモの塊茎で発現させる場合には、パタチン遺伝子のプロモーター (Rocha-Sosa, M. et al., *EMBO J.*, 8, 23-29, 1989) が、サツマイモの塊根で発現させる場合には、スポラミン遺伝子のプロモーター (Hattori, T. and Nakamura, K., *Plant Mol. Biol.*, 11, 417-426, 1988) が、ホウレン草などの野菜の葉で発現させる場合には、リブローズ-1,5-ビスリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子のプロモーター (Orozco, B. M. and Ogren, W. L., *Plant Mol. Biol.*, 23, 1129-1138, 1993) が好適である。

本発明においてベクターの導入される植物細胞には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

植物細胞へのベクターの導入は、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法 (エレクトロポレーション)、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など当業者に公知の種々の方法を用いることができる。形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である (Toki ら (1995) *Plant Physiol.* 100:1503-1507 参照)。例えば、イネにおいては、形質転換植物体を作成する手法については、ポリエチレングリコールによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体 (インド型イネ品種が適して

いる)を再生させる方法 (Datta, S.K. (1995) In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg Eds.) pp66-74)、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体(日本型イネ品種が適している)を再生させる方法 (Toki et al (1992) Plant Physiol. 100, 1503-1507)、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法 (Christou et al. (1991) Bio/technology, 9: 957-962.) およびアグロバクテリウムを介して遺伝子を導入し、植物体を再生させる方法 (Hiei et al. (1994) Plant J. 6: 271-282.) など、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

一旦、ゲノム内に本発明の DNA が導入された形質転換植物体が得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料(例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等)を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明の DNA が導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクロンの繁殖材料が含まれる。本発明の植物体は、好ましくは単子葉植物であり、さらに好ましくはイネ科植物であり、最も好ましくはイネである。

また本発明は、本発明の RISBZ 遺伝子を利用して、外来遺伝子産物を高度に発現させた植物体を提供する。本発明の該植物体は、発現制御領域の下流に本発明の DNA が機能的に結合した DNA 構築物、および標的配列を有する発現制御領域の下流に外来遺伝子が機能的に結合した DNA 構築物をゲノム上に有する。

発現制御領域の下流に本発明の DNA もしくは外来遺伝子が「機能的に結合した」とは、発現制御領域に転写因子が結合することにより、本発明の DNA もしくは外来遺伝子の発現が誘導されるように、発現制御領域と本発明の DNA もしくは外来遺伝子が結合していることをいう。

標的配列とは、転写因子である本発明の RISBZ タンパク質が結合する DNA 配列

2 1

をいい、好ましくは GCN4 モチーフまたは G/C ボックスを含む DNA 配列である。GCN4 モチーフとしては、種々の遺伝子内に見られる以下のような配列を例示することができる。

・ GCN4 モチーフ (GCN4 モチーフを含む遺伝子名)

GCTGAGTCATGA／配列番号：8 (GluB-1)

CATGAGTCACTT／配列番号：9 (GluA-1)

AGTGAGTCACTT／配列番号：10 (GluA-3)

GGTGAGTCATAT／配列番号：11 (LMWG)

GGTGAGTCATGT／配列番号：12 (Hordein)

GATGAGTCATGC／配列番号：13 (Gliadin)

AATGAGTCATCA／配列番号：14 (Secalin)

標的配列として好ましい GCN4 モチーフ配列としては、「GCTGAGTCATGA／配列番号：8」、「GATGAGTCATGC／配列番号：13」および「AATGAGTCATCA／配列番号：14」が例示される。G/C ボックスとして具体的には、配列「AGCCACGTCACA／配列番号：15」が例示される。また、本発明の標的配列としては、上記の GCN4 モチーフまたは G/C ボックスがタンデムに繰り返えされた配列も含まれ、好ましくは GCN4 モチーフまたは G/C ボックスが4回タンデムに繰り返えされた配列を挙げることができる。

外来遺伝子としては、例えば、抗体、酵素、生理活性ペプチドをコードする遺伝子を挙げることができる。

さらに本発明は、本発明の RISBZ 遺伝子を利用した、外来遺伝子産物を高度に発現させるための植物体の作出方法を提供する。該植物体の作出方法としては、例えば、「発現制御領域の下流に本発明の DNA が機能的に結合した DNA 構築物をゲノム上に有する植物体」、および「本発明のタンパク質の標的配列を有する発現制御領域の下流に外来遺伝子が機能的に結合した DNA 構築物をゲノム上に有する植物体」を交配させる方法が挙げられる。

上記「発現制御領域の下流に本発明の DNA が機能的に結合した DNA 構築物」、および「標的配列を有する発現制御領域の下流に外来遺伝子が機能的に結合した DNA 構築物」の植物ゲノムへの導入は、当業者によって一般的に行われている方法、例えば前記のアグロバクテリウムを用いた方法によって行うことができる。

また、植物体の交配は当業者によって一般的に行われる方法によって行うことができる。例えば、自殖を防ぐために、交配当日に剪穎法による除雄、あるいは交配当日に温湯除雄を行い花粉のみを不稔化し、花粉親の穂をゆすり受粉させる。

図面の簡単な説明

図 1 は、RISBZ タンパク質および 02 様 bZIP タンパク質のアミノ酸配列の相同性に基づいて作成された系統樹を表す図である。これらのタンパク質の類似性および進化的類縁関係を理解するために、全長のアミノ酸配列どうしの比較を行った。

図 2 は、RISBZ タンパク質および 02 様 bZIP タンパク質のアミノ酸配列の比較を表す図である。50%以上保存されているアミノ酸を白抜きで示した。推定上の核移行シグナル(NLSA; SV40-like motif)(Varagona M. J. et al. Plant Cell 4: 1213-1227, 1992)およびセリンリッチリン酸化サイトは二重線および破線で示した。太線は塩基性ドメインを示し、この領域は 2 因子性の核移行シグナル(NLSB)構造も備えている。ロイシンリピートは下向きの矢印で示した。イネ bZIP プローブの作成に用いたプライマーは右および左向きの矢印で示したアミノ酸配列を基に設計された。BLZ1(Vicente-Carbojos J. et al. Plant J. 13: 629-640, 1998)および BLZ2(Onate L. et al. J. Biol. Chem. 274: 9175-9182, 1999)はオオムギ、02(Hartings H. et al. EMBO J. 8: 2795-2801, 1989)および OHP1(Pysh L. D. et al. Plant Cell 5: 227-236, 1993)はトウモロコシ、SPA はコムギ(Albani D et al. Plant Cell 9: 171-184, 1997)、02-sorg はソルガム(Pirovano L. et al. Plant Mol. Biol. 24: 515-523, 1994)、02-coix はハ

23

トムギ (Vettore A. L. et al. Plant Mol. Biol. 36: 249-263, 1998)から単離された 02 様 bZIP タンパク質を表す。

図 3 は、図 2 の続きの図である。

図 4 は、02 様 bZIP タンパク質をコードする遺伝子の構造を表す図である。オムギの BLZ1 遺伝子およびトウモロコシ(02) (Hartings H. et al. EMBO J. 8: 2795-2801, 1989)、ソルガム(02-sorg)、ハトムギ(02-coix)の Opaque2 遺伝子のイントロン／エキソン領域の構造を示した。太線および細線はそれぞれエキソンおよびイントロンを示す。数字はエキソンおよびイントロンの塩基数を表している。

図 5 は、RISBZ 遺伝子の転写パターンを示すノーザンプロットの写真である。根、実生および登熟過程の種子(5, 10, 15, 20 および 30 DAF)より抽出した全 RNA について、bZIP ドメイン下流域の固有な塩基配列をプローブに用いたノーザンプロット分析を行った。転写パターンを比較するために、GluB-1 遺伝子コード域をプローブに用いた実験も行った。対照として、25S rRNA のエチジウムブロマイドによる染色像を示した。

図 6 は、形質転換イネにおける RISBZ1 プロモーター／GUS レポーター遺伝子の組織化学的解析結果を表す図および写真である。

(A) RISBZ1 プロモーター／GUS レポーター遺伝子の模式図である。(a)および(b)、RISBZ1 遺伝子の転写開始点より数えて-1674～+4 番目の塩基までの配列および uORF を含む-1674～+213 番目の塩基までの配列をそれぞれバイナリーベクター上の GUS レポーター遺伝子に繋いだ。(c)、GluB1 プロモーター (-245 - +18)配列をプラスミドベクター上の GUS レポーター遺伝子と連結した。

(B) 登熟過程の種子における GUS レポーター遺伝子の発現を示す写真である。レポーター遺伝子が導入されたイネの種子(10DAF)を縦方向に切ったのちに X-gluc 液に浸して 37°Cで保温した。EN は胚乳、EM は胚を表す。

(C)形質転換イネの種子抽出液の GUS 活性を示すグラフである。解析には

24

15DAF の種子を用いた。導入遺伝子のプロモーター構造はそれぞれ(A)の(a)および(b)に示した通りである。縦線は平均値を表す。MU は 4-methylumbelliferone を表す。

図 7 は、GluB1 プロモーター上の RISBZ1 タンパク質結合サイトの同定のための、メチレーション干渉実験によるゲル泳動写真である。GluB1 遺伝子のプロモーター断片(-245 ~ +18)のそれぞれの鎖(Top および Bottom)を片方ずつ標識した。それぞれの鎖を部分的にメチル化した後に GST-RISBZ1 タンパク質と共に保温し、タンパク質と結合したプロモーター断片と結合しなかった断片をそれぞれ回収し、ピペリジンによって化学的に切断してから電気泳動した。ピペリジンによって切断されなかったサイト(*印)が GCN4 モチーフの中からのみ見出された。

図 8 は、RISBZ1 タンパク質の GCN4 モチーフに対する結合能を調べたゲルシフト分析の泳動写真である。

(A)プローブおよびコンペティターとして用いたオリゴヌクレオチドの配列
WILD: GluB-1 プロモーター (-175 to -155)の GCN4 モチーフを含む 21 bp の DNA 断片。M1-M7: 3bp ずつ変異が加えられた 21 bp の DNA 断片のシリーズ。GCN4 モチーフは線で囲んで示した。

(B)-(F) GST-RISBZ 融合タンパク質をゲルシフト分析に用いた。プローブとして 21 bp の DNA 断片(WILD)を加えた。(B)GST-RISBZ1; (C)GST-RISBZ2; (D)GST-RISBZ3; (E)GST-RISBZ4; (F)GST-RISBZ5 コンペティターはプローブに対して 100 倍以上の化学量比になるように加えた。レーン 1: タンパク質なし、レーン 2: コンペティターなし、レーン 3-10: コンペティターあり (wild type (W)、および M1-M7)

図 9 は、RISBZ1 と他の RISBZ とのヘテロダイマー形成能を示す図および写真である。

(A)in vitro 転写／翻訳反応の鋳型として用いたベクターの構造を示す。ベクターはそれぞれ、完全長 RISBZ1 タンパク質、および short-form-RISBZ2

(sRISBZ2 : 218 to 329), -RISBZ3 (sRISBZ3 : 126 to 237)タンパク質をコードする。

(B)DNA 結合実験の結果を示すゲル泳動写真である。レーン 2, 4, 6, および 8 では、完全長または short-form タンパク質と結合した DNA の複合体が検出された。レーン 3 および 7 では、完全長 RISBZ1 タンパク質と short-form タンパク質のヘテロダイマーと結合した DNA の複合体が検出された。

図 10 は、トランジェント解析による転写活性化ドメインの同定結果を示す図である。

(A)レポーターおよびエフェクタープラスミドの構造を示す。9 コピーの GAL4-DNA 結合サイトと CaMV35S のコアプロモーター配列が連結された GUS 遺伝子をレポーターとして用いた。エフェクタープラスミドは truncated RISBZ1 タンパク質の N 末端側に GAL4 DNA 結合ドメインが連結されたタンパク質をコードする。

(B)レポーターおよびエフェクタープラスミドを用いた時の GUS 活性を示すグラフである。

図 11 は、RISBZ1 および変異型 RISBZ1 タンパク質の N 末端領域のハイドロパシーパターンを示す図である。Kyte and Doolittle (Kyte J. and Doolittle R. F. J. Mol. Biol. 157: 105-132, 1982)の計算式で求められた RISBZ1(WT)、および変異型 RISBZ1(M1-8)タンパク質のハイドロパシーパターンを示した。正の数値は疎水性であることを表す。

図 12 は、GUS 活性を指標とした RISBZ1 の転写活性測定系の概略図、ノーザン解析の写真、および GUS 活性測定結果を示す図である。グラフの縦軸は、各転写因子の転写活性の強さの指標である GUS 活性を表す。

図 13 は、転写因子 RISBZ1、Opaque2、SPA、および RISBZ3(RITA1)の認識配列を調べた実験の結果を表す図である。グラフの縦軸は、各転写因子の転写活性の強さの指標である GUS 活性を表す。実験に使用した配列を下段に列記した。

図 14 は、種々の遺伝子由来の GCN4 モチーフに対する本発明の RISBZ1 の転写

26

活性能を表す図である。グラフの縦軸は、各転写因子の転写活性の強さの指標である GUS 活性を表す。実験に使用した GCN4 モチーフの塩基配列を下段に列記した。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例 1〕 種子 cDNA ライブラリーからの bZIP 型転写因子をコードする cDNA クローンの単離

イネ(*Oryza sativa* L. c.v. Mangetumochi)を水耕栽培し、14 日目の葉および根を液体窒素で凍結させ、使用直前まで-80℃で保存した。登熟期の種子は圃場より採種した。

02 様タンパク質の bZIP ドメイン内の保存性の高いアミノ酸配列(SNRESA および KVKMAED)を基に設計されたプライマーを用意し、これを用いてイネ種子より調製した polyA⁺ mRNA を鋳型とする RT-PCR 反応を行った。Poly(A)RNA は開花後 6-16 日(day after flowering; DAF)の種子より抽出し(Takaiwa F et al. Mol. Gen. Genet. 208: 15-22, 1987)、プライマーとして oligo(dT)₂₀を用いて Superscript reverse transcriptase (Gibco BRL, Paisly, UK)による逆転写反応を行って一本鎖 cDNA の合成した。次いで、穀物の種子で発現している bZIP 型転写因子において保存性の高いアミノ酸配列に基づいて設計された 1 組のプライマー(5'-TCC AAC/T A/CGI GAA/G A/TCI GC-3' ; 配列番号 : 16、および 5'-GTC CTC C/TGC CAT CTT CAC CTT-3' ; 配列番号 : 17)を用いて cDNA の増幅を試みた。一本鎖 cDNA を PCR 反応混合液(10mM Tris-HCl pH8.3、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、0.01%(W/V)ゼラチン、200μM dNTPs、1μM プライマー)に溶解し、TaqI ポリメラーゼを加え、サーマルサイクラー中で 94℃、5 分間保温後 94℃、1 分 → 40℃、1 分 → 72℃、2 分の反応を 3 サイクルの後、94℃、1 分 →

55°C、1分 → 72°C、2分の反応を30サイクル継続することにより cDNA の合成と増幅を行った。増幅された DNA 断片は TA クローニングベクター(pCR2.1; Invitrogen)に繋いでクローン化した後に、ABI PRISM dye terminator sequence system によってシーケンス反応を行い、得られた反応産物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Perkin Elmer-Applied Biosystems)を用いて解析し、少なくとも 50 個のクローンの塩基配列を決定した。得られたデータは GENETYX、および BLAST アルゴリズムを用いてそれぞれ塩基配列の解析およびデータベース検索を行った。その結果、213bp の DNA 断片が 5 種類得られたことが判った。これらの内 2 つは REB(Izawa T. et al. Plant Cell 6: 1277-1287, 1994)および RITA1(Nakase M. et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-522, 1997)の bZIP ドメインの配列と同じであった。それぞれの断片に対応する完全長の cDNA を得るために高いストレンジェンシーの条件で、これら 5 種類の 213bp の DNA 断片をプローブに用いて、登熟期(6-16DAF)の種子の mRNA より作製した cDNA ライブラリー(ZAPII; STRATAGENE)をスクリーニングした。DNA 断片はランダムプライマー法(Amersham Pharmacia Biotech)により [α -³²P] -dCTP を取こませプローブとした。プレハイブリダイゼーション液としては 5x SSC 5x Denhard's 液、0.1%SDS、50%ホルムアミド、100 μ g/ml サケ精子 DNA の混合液を用いた。フィルターを 55°Cで 2x SSC、0.1% SDS の混合液によって 1 回、0.1x SSC 0.1% SDS の混合液によって 55°Cで 2 回洗浄した。

その結果、得られた cDNA クローンはそれぞれ塩基配列の相同性に基づいて、RISBZ(rice seed b-Zipper)1 (配列番号: 1), RISBZ2, RISBZ3, RISBZ4 (配列番号: 4), RISBZ5 (配列番号: 6) と命名した。RISBZ2 および RISBZ3 は既に種子および葉の cDNA ライブラリーから単離されている REB(Izawa T. et al. Plant Cell 6: 1277-1287, 1994)および RITA1(Nakase M. et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-522, 1997)と同一であった。

[実施例2] RISBZ cDNA の同定

新たに同定された RISBZ cDNA(RISBZ1, RISBZ4, RISBZ5)について詳しい特徴付けを試みた。1742bp (poly(A)は除く) の RISBZ1 cDNA は最も長く、推定される分子量が 46491Dal の 436 アミノ酸をコードする読み枠を含んでいた。RISBZ4 および RISBZ5 はそれぞれ 278 および 295 アミノ酸をコードする読み枠が存在し、推定される分子量はそれぞれ 29383Dal および 31925Dal であった。

RISBZ1 mRNA のリーダー配列は 245b であり、通常の場合よりも長い。興味深いことに、実際の開始コドンより上流のリーダー配列中から 31 アミノ酸をコードする小さな読み取り枠が見出された。同様な上流に位置する小さな読み取り枠(uORF)は、トウモロコシ O2(Hartings H. et al. EMBO J. 8: 2795-2801, 1989)、コムギ SPA(Albani D. et al. Plant Cell 9: 171-184, 1997)、オオムギ BLZ1、および BLZ2(Vicente-Carbojos J. et al. Plant J. 13: 629-640, 1998; Onate L. et al. J. Biol. Chem. 274: 9175-9182, 1999)からも見出されているが、これらは互いの相同性はほとんどない。トウモロコシ O2mRNA の uORF は翻訳調節に関与していることが報告されている。uORF は RISBZ1 mRNA のみに存在し、他の RISBZ mRNA からは見出されなかった。

開始コドンを含む周辺の配列は GCAATGG である。この配列は単子葉植物から見出されている真核生物の翻訳開始配列 c(a/c)(A/G)(A/C)cAUGGCG と一致していた。開始コドンと uORF は 100bp 離れていた。RISBZ1 をコードする読み取り枠には 2 つの同じ終始コドン(TAG)コードされていた。終始コドンと poly(A)までの長さは 229bp であった。poly(A)が付加される位置から数えて-19~-24 の領域にポリアデニル化シグナル配列(AATATA)が見出された。

RISBZ1 はイネ REB (Nakase M. et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-522, 1997)、トウモロコシ OHP-1、OHP-2 (Pysh L. D. et al. Plant Cell 5: 227-236, 1993)、およびオオムギ BLZ1(Vicente-Carbojos J. et al. Plant J. 13: 629-640, 1998)(図 1)と近縁であり、それぞれ 48.2% (イネ REB)、45.7%

2・9

(オオムギ BLZ1)、46.6% (トウモロコシ OHP1) のアミノ酸配列の相同性を示した。さらにこれらの bZIP ドメインの保存性は高かった (73.7% ~76.3%)。RISBZ4 および RISBZ5 と、RITA1 (RISBZ3) とのアミノ酸レベルでの相同性はそれぞれ 88.8% および 47.6 % であった。一方、RISBZ4 と RISBZ5 との相同性は 48.2% であった。RISBZ3、4 および 5 はこれまでに報告されている 02 様転写因子の中でユニークなグループを構成していた。さらに、種子 cDNA ライブラリーから単離された 5 つの RISBZ cDNA 群はアミノ酸の相同性に基づいて 2 つに分類できた (図 1)。また、RISBZ1、および RISBZ2 に見出される N および C 末端領域は、RISBZ3、RISBZ4、および RISBZ5 では欠失しており、その結果として 100~150 アミノ酸ほどサイズが減少していた (図 2、3)。

RISBZ1 および RISBZ2 のアミノ末端はプロリンに富んでいたが、他の RISBZ タンパク質ではこの領域が欠失していた (図 2、3)。RISBZ1 および RISBZ2 の N 末端から数えて 60 番目のアミノ酸の周辺領域、および bZIP ドメインの上流に位置する中央の領域は酸性アミノ酸に富んでいた。これらの酸性アミノ酸およびプロリンに富んでいる配列は、他の 02 様転写因子からも見出されている。

RISBZ1 の領域 207~210 からセリンに富んだ配列 (SGSS) が見出され、カゼインカイネース II の標的配列である可能性が考えられた (Hunter T. and Karin M. Cell 70: 375-387, 1992) (図 2、3)。同様な配列 (SSSS) は RISBZ2 からも見出されたが、他の RISBZ タンパク質ではこの配列が欠失していた (図 2、3)。

これまでにトウモロコシの Opaque2(02) タンパク質の細胞質から核への輸送にかかわる 2 つの核移行シグナル (NLSA: SV-40 様モチーフ、NLSB: 2 因子性モチーフ) (Varagona M. J. et al. Plant Cell 4: 1213-1227, 1992) が同定されている。これらのモチーフの検索を RISBZ1 に対して行った結果、02 と同じ位置 (101~135 および 232~264) から NLSA および NLSB と相同性を示す配列が見出された。

30

RISBZ1cDNA を基に設計されたプライマーを用いて、プロモーターおよび RISBZ1 タンパク質をコードするゲノム領域を単離した。PCR 反応は、RISBZ1 cDNA の配列に基づいて設計された 2 組みのオリゴヌクレオチド (RIS1f: 5'-ATGGGTTGCGTAGCCGTAGCT-3' / 配列番号: 18、RELr5: 5'-TTGCTTGGCATGAGCATCTGT-3' / 配列番号: 19)、および (RELf2: 5'-GAGGATCAGGCCCATAT-3' / 配列番号: 20、RIS1r: 5'-TCGCTATATTAAGGGAGACCA-3' / 配列番号: 21) をプライマーとして用い、イネゲノミック DNA を鋳型として、TAKARA LA Taq (TAKARA) を使用して行った。サーマルサイクラー中で 98°C、10 秒 → 56°C、30 秒 → 68°C 5 分を 30 サイクルの PCR 反応を行い DNA 断片を増幅した。RISBZ1 遺伝子プロモーター領域を Liu ら (25) の方法に基づいた thermal asymmetric interlaced (TAIL) PCR によって増幅した。3 つのオリゴヌクレオチド (tail1: 5'-TGCTCCATTGCGCTCTCGGACGAG-3' / 配列番号: 22, tail2: 5'-ATGAATTCGCGAGGGGTTTTCGA-3' / 配列番号: 23, tail3: 5'-GTTTGGGAGAAATTCGATCAAATGC-3' / 配列番号: 24) を特異的プライマーとして用いた。

その結果、RISBZ1 遺伝子は 6 個のエキソンと 5 個のイントロンで構成されていることが判った (図 4)。RISZ1 遺伝子のエキソン/イントロンの構成はトウモロコシの O2 (Hartings H. et al EMBO J. 8: 2795-2801, 1989)、ソルガムの O2 (Pirovano L. et al. Plant Mol. Biol. 24: 515-523, 1994)、ハトムギの O2 (Vettore A. L. et al. Plant Mol. Biol. 36: 249-263, 1998) およびオオムギの BLZ1 (Vicente-Carbojos J. et al. Plant J. 13: 629-640, 1998) 遺伝子と同じであった (図 4)。

RISBZ1 遺伝子の転写開始点をプライマーエクステンション解析によって決定した。プライマーエクステンション解析は Sambrook et al. (Sambrook J. et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., pp.7.79-7.83, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)) の方法に従った。

31

すなわち、目的とする領域のすぐ下流の配列と相補的な 30nt のオリゴヌクレオチドを T4 キナーゼにより 5' 末端標識し、5' - ATGGTATGGTGTTCCTAGCACAGGTGTAGC -3' (配列番号: 25) からなるプライマーを作製した。このプライマーを用いて 5 μ g の mRNA を鋳型とした逆転写反応 (Superscript reverse transcriptase kit(Gibco BRL, Paisly, UK)) を行った。逆転写反応は、混合液(20 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 μ M dNTP, 10⁵ cpm プライマー, 5 μ g mRNA, 200 unit Superscript revers transcriptase(Gibco BRL, Paisly, UK))を、42°Cで 50 分反応させて行った。

その結果、開始コドンから数えて 245nt 上流に転写開始点がマップされた。転写開始点から -30~-35 の位置には TATA ボックスが見出された。3つの ACGT モチーフが転写開始点から数えて 63bp、123 bp および 198 bp 上流に見出されたが、種子特異的発現にかかわるモチーフ (例えば GCN4 および AACA など) は見出されなかった。一方、Dof ドメインタンパク質の認識配列(AAAG)は数多く見出された。これらのモチーフが RISBZ1 遺伝子の時期・組織特異的発現に関わっている可能性が考えられる。例えば ACGT モチーフが RISBZ1 タンパク質の標的配列であれば、RISBZ1 遺伝子は自己調節(autoregulate)されている可能性がある。しかしながら RISBZ1 プロモーター/GUS レポーター遺伝子および 35S CaMV プロモーター/RISBZ1 遺伝子をプロトプラストへ導入した結果、レポーター遺伝子の転写活性化は観察されなかった。このデータから、RISBZ1 プロモーターには RISBZ1 タンパク質の標的配列配列は含まれていないことが示唆された。すなわち、RISBZ1 プロモーターから見出された ACGT モチーフは RISBZ1 の標的配列ではない。従って、RISBZ1 遺伝子が自己調節されている可能性は低い。一方、Dof ドメインを認識する RPB (rice prolamin box binding factor)遺伝子の過剰発現によって、RISBZ1 プロモーター/GUS レポーター遺伝子の転写が活性化されたことから、Dof ドメインタンパク質の認識配列は RISBZ1 遺伝子の特異的発現にかかわっている可能性が示唆された。

[実施例 4] RISBZ mRNA の組織特異性

RISBZ 遺伝子の発現を調査するためにノーザンブロット分析を試みた。高岩らの方法(Varagona M. J. et al. Plant Cell 4: 1213-1227, 1992)に依って、開花後 5 日目から 30 日目の種子(5, 10, 15, 20, および 30 DAF)、ならびに根および実生から全 RNA を抽出し、アガロースを用いて分画した後にメンブレンに転写した。プローブには RISBZ cDNA の bZIP ドメインコード域下流配列から 3' 非翻訳領域にわたる領域を用いた。使用したプローブの領域は次の通りである。

- ・ RISBZ1 1388 位から 1742 位までの 354bp
- ・ RISBZ2 1351 位から 1696 位までの 346bp
- ・ RISBZ3 741 位から 1226 位までの 486bp
- ・ RISBZ5 742 位から 1362 位までの 621bp

ハイブリダイゼーションは 5x SSC 5x Denhard's 液、0.1% SDS、50% ホルムアミドの混合液中で 45°C にて行った。フィルターを 2x SSC、0.1% SDS の混合液、次いで 0.1x SSC 0.1% SDS の混合液でそれぞれ 2 回ずつ 30 分間洗浄した。

図 5 に示すように、RISBZ1 遺伝子は種子でのみ発現していたおり、他の組織における発現は検出されなかった。RISBZ1 mRNA の蓄積量は開花後 5 日から 10 日(5 ~10 DAF)にかけて最も高かった。このような高い mRNA 量は開花後 15 日まで続き、その後種子の登熟とともに低下した。RISBZ1 遺伝子の発現はグルテリン遺伝子とは少し異なり、RISBZ1 遺伝子の方が早く発現量のピークを迎えた。グルテリン mRNA は 5 DAF から検出されはじめ 15 DAF に蓄積量のピークを迎えたのち、徐々に減少した(図 5)。この結果は、RISBZ1 がグルテリン遺伝子の活性化因子として機能している可能性を示唆している。同様な発現パターンはトウモロコシの O2 (Hartings H. et al EMBO J. 8: 2795-2801, 1989), コムギの SPA (Albani D et al. Plant Cell 9: 171-184, 1997) およびオオムギの BLZ2 遺伝子(Onate L. et al. J. Biol. Chem. 274: 9175-9182, 1999)においても報告さ

3 3

れている。

RISBZ2 は今回調査した全ての組織で発現していた。RISBZ3 および 4 は登熟過程後期の種子で特異的に発現していた(図 5)。RISBZ3 および 4 の mRNA は、20DAF まで徐々に増加したのちに減少した。RISBZ5 は他の RISBZ 遺伝子と比較して発現量が大幅に低かった。mRNA 量のピークは 10DAF に迎えた。

〔実施例 5〕 形質転換体における RISBZ1 プロモーター/GUS レポーター遺伝子の発現

RISBZ1 遺伝子の発現パターンをさらに調べるために、転写開始点から数えて-1674 の位置から+213 までの配列を GUS 遺伝子の上流に繋いだ。このレポーター遺伝子を、アグロバクテリウムを用いてイネに導入した(図 6 A)。形質転換イネ (*Oryza sativa* L. c.v. kitaake)の作出は、具体的には次のようにして行った。PstI あるいは BamHI サイトが 5' 末端に付加されたプライマー(5'-AAAACTGCAGTTTTCTGA -3' / 配列番号: 26、および 5'-AATGGATCCGCGAGGGGTTTTTCGAA -3' / 配列番号: 27)を用いて、RISBZ1 遺伝子の 5' 隣接域 (-1674 ~+4 および -1674 ~+213) を PCR で増幅した。PCR 反応は、PCR 反応混合液(10mM Tris-HCl pH8.3、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、0.01%(x/v)ゼラチン、200μM dNTPs、1μM プライマー、鋳型 DNA 0.5μg、2.5 unit Taq I ポリメラーゼ)を、94°Cで 1 分/50°Cで 1 分/72°Cで 2 分を 30 サイクルで行った。PCR 産物を PstI および BamHI で切断したのちに pBI201 に繋がないで後に、PstI および SacI で切断した。その結果、切り出された RISBZ1 プロモーター/GUS 遺伝子を含む DNA 断片を、バイナリーベクター p8cHm の Sse8387I サイトおよび SacI サイトに繋いだ。p8c は CaMV35S プロモーター/ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ(HPT)遺伝子をコードしている。形質転換の方法は後藤らの論文(Goto F. et al. Nature Biotech. 17: 282-286)の記述に従った。

レポータープラスミドの構築は次のようにして行った。Wu ら(Wu C. Y. et al.

Plant J. 14: 673-683, 1998)により構築された 1x21bp、3x21bp、5x21bp GCN4 モチーフ/GUS 遺伝子をレポーターとして用いた。5' 側に突出末端 (ACGT) が付加された一組の互いに相補的な 48bp のオリゴヌクレオチドを会合させて、正常型 12bp GCN4 モチーフ (GCTGAGTCATGA/配列番号: 8) および変異型 GCN4 モチーフ (GCTTCCTCATGA/配列番号: 28) の 4 量体を作製した。これらの 2 本鎖のオリゴヌクレオチドを -46CaMV/GUS レポーター遺伝子の SalI および StuI サイトに挿入した。

また、イネカルスプロトプラストを用いたトランジェントアッセイの方法は Wu らの論文の記述に従った。GUS 活性の測定は Jefferson (Jefferson R. A. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405, 1987) の方法に従い、glucuronide 前駆体から生成された 4-methyl-umbelliferone の蛍光量を測定した。Bio Rad Kit を用いて、タンパク質濃度を測定した。標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

図 6B に示すように、高い GUS 活性が登熟期種子の糊粉層および副糊粉層で検出され、胚では認められなかった。根、葉および茎からの GUS 活性は高感度の蛍光法による分析を行っても検出されなかった。以上の結果から、RISBZ1 遺伝子の発現領域が糊粉層および副糊粉層に限られていることが示唆された。5' 非翻訳領域および uORF の機能を調べるために、転写開始点から数えて -1674 の位置から +4 までの uORF を含まない配列 (図 6A) によって GUS 遺伝子を発現させた植物体と GUS 活性を比較した。その結果、uORF の欠失によって発現部位の変化はなかった (図 6B) が、5~10 倍のプロモーター活性の減少が引き起こされた (図 6C)。これらのデータから、5' 非翻訳領域は正の翻訳調節を担っている可能性が示唆され、トウモロコシ 02 において uORF が翻訳の抑制因子として機能している (Lohmer S. et al. Plant Cell 5: 65-73) ことを示しているデータとは対照的な結果が得られた。

[実施例6] 5種のRISBZタンパク質のGCN4モチーフへの結合を介した転写活性化能

5種のRISBZタンパク質のGCN4モチーフへの結合を介した転写活性化能を、トランジェントアッセイによって調べた。まず、エフェクターとしてCaMV35Sプロモーターの下流にそれぞれのRISBZタンパク質のコード配列を繋いだプラスミドを用意した。エフェクタープラスミドの作製は、次のようにして行った。N末端領域が欠失したRISBZ1をコードするプラスミドはPCRを用いて作製した。

RISBZ1のN末端から数えて41、81、121および161番目のアミノ酸からC末端までの領域をコードするcDNAを増幅するように以下のプライマーを設計した。

・フォワードプライマー

RIS1-1: 5' - AACCATGGTGCTGGAGCGGTGCCCGT -3' (配列番号: 29)

RIS1-2: 5' - AACCATGGCGGCGGAGGCGGCGGCG -3' (配列番号: 30)

RIS1-3: 5' - CCCCATGGAGTACAACGCGATGC -3' (配列番号: 31)

RIS1-4: 5' - AACCATGGTTGGTTCCATCCTGAGT -3' (配列番号: 32)

RIS1-5: 5' - AACCATGGCTCATGCCAAGCAAGCT -3' (配列番号: 33)

RIS1-6: 5' - AACCATGGATGAAGAAGATAAAGTGAAG -3' (配列番号: 34)

・リバースプライマー

BRIS1R: 5' - TAGGATCCGCTCCTACTACTGAAGCT -3' (配列番号: 35)

これらのプライマーの5'末端にはNcoI、またはBamHIサイトを付加した。N末端領域の欠失により失われた翻訳開始コドンの代わりとして、NcoIサイトのATGを利用した。94°Cで2分、94°Cで1分/50°Cで1分/72°Cで2分を30サイクル、72°Cで5分のPCR反応により増幅したcDNAをNcoIおよびBamHIで切断し、次いでアガロースゲルで精製した。得られたcDNAをpRT100(Topfer R. et al. Nucl. Acids Res. 15: 5890, 1987)に挿入した。

RISBZ1およびRISBZ2と、GAL4DNAドメイン(アミノ酸残基1~147番目)との融合タンパク質をコードするプラスミドを構築した。まず、RISBZ1および

36

RISBZ2 の様々な N 末端領域をコードする cDNA 領域を Pfu Taq ポリメラーゼ (STRATAGENE) を用いた PCR で増幅するために、フォワードプライマーと BamHI サイト、終止コドンおよび SstI サイトが 5' 末端に付加されたリバープライマーを用意した。各プライマーの塩基配列は以下の通りである。

・フォワードプライマー

RISBZ1-F1: 5' - AAGGATCCAATGGAGCACGTGTTCCGCC -3' (配列番号: 36)

RISBZ1-F2: 5' - AAGGATCCGGCGGCGGAGGCGGCGCG -3' (配列番号: 37)

RISBZ1-F3: 5' - GCCGGATCCAGTTGGTTCCATCCTGAG -3' (配列番号: 38)

RISBZ1-F4: 5' - AAGGATCCTGATGAAGAAGATAAAGT -3' (配列番号: 39)

RISBZ1 F1-2: 5' - AAGGATCCAGGAGTAGATGACGTCGGC -3' (配列番号: 40)

RISBZ1 F1-3: 5' - AAGGATCCAGACGAGATCCCCGACCCGCT -3' (配列番号: 41)

・リバープライマー

RISBZ1-R1: 5' - TAGAGCTCTACGCCGCCGGCATCGGGCT -3' (配列番号: 42)

RISBZ1-R2: 5' - TAGAGCTCTAAAGGATCATATTTCCCAT -3' (配列番号: 43)

RISBZ1 R1-1: 5' - TAGAGCTCTAGGCGGCCGCCGGCTG -3' (配列番号: 44)

RISBZ1 R1-2: 5' - TAGAGCTCTACGGCGGCGGCGGAGCCCA -3' (配列番号: 45)

上記のプライマーを用いて、94°Cで2分、94°Cで1分/50°Cで1分/72°Cで1分、72°Cで5分のPCR反応により、RISBZ1 および RISBZ2 の様々な N 末端領域をコードする cDNA を増幅し、BamHI および SacI で切断し2%アガロースゲルで精製した。得られた cDNA を同じ制限酵素で切断された 35S-564 ベクターの GAL4DNA ドメインコード域下流に読み枠が合うように繋いだ。RISBZ1 の N 末端領域への変異の挿入には PCR を利用した。cDNA 配列を確認した後に、アミノ酸残基 1~57 番目の領域を PCR で増幅した。得られた産物を GAL4DNA ドメインコード域下流に読み枠が合うように繋いだ。

さらに、1 および 3 個の 12bpGCN4 モチーフあるいは 1 および 5 個の 21bpGCN4 モチーフと GUS 遺伝子を連結したレポータープラスミドも用意した。さらにネガ

タイプコントロール実験では、4x 変異型 12bpGCN4 モチーフ/GUS レポータープラスミドを用いた。変異型 12bpGCN4 モチーフは正常型とは RISBZ1 および 02 の標的配列が変異している。これらのプラスミドを単独、あるいはレポータープラスミドやエフェクタープラスミドと組み合わせることによりカルスより調製したプロトプラストへ導入した後に、GUS 活性を測定した。レポータープラスミドおよびエフェクタープラスミドをそれぞれ単独でプロトプラストへ導入しても低いレベルの GUS 活性が観察されたに過ぎなかった。表 1 に示すようにエフェクタープラスミドとして導入された 35S /RISBZ1 または 35S /02 の存在下で、レポーター遺伝子の転写が活性化された。変異型 12bpGCN4 モチーフの下流の GUS 遺伝子転写活性は、前述のエフェクタープラスミドの存在下でもバックグラウンドレベルであった。この結果から、RISBZ1 遺伝子産物は GCN4 モチーフを介してレポーター遺伝子を活性化させることが示された。RISBZ1 による転写活性のレベルは 02 よりも若干高く、また表 2 に示すように、GCN4 モチーフのコピー数に乗じて上昇した。1~12 コピーの 21bpGCN4 モチーフについて調べた結果、9 コピーまで直線的に転写活性のレベルが上昇した。しかしながら、35S CaMV プロモーターによって他の RISBZ 遺伝子を発現させても、レポーター遺伝子の転写活性は RISBZ1 や 02 の場合と比較して 1.4%以下のレベルしか検出されなかった。つまり RISBZ1 タンパク質のみが GCN4 モチーフの結合を介して転写を活性化させることが分かった。

(表 1)

エフェクター	GUS 活性 (pM 4-MU/min/mg protein)
35S/Opaque2	2658 ± 318
35S/RISBZ1	2994 ± 157
35S/RISBZ2	44 ± 7
35S/RISBZ3	1.3 ± 1.2
35S/RISBZ4	17.3 ± 0.9
35S/RISBZ5	31 ± 8.8

4x12bp GCN4 モチーフ/GUS レポーター遺伝子をエフェクタープラスミドと共にプロトプラストに導入して、GUS 活性を測定した。3 回の反復実験を行った。

(表 2)

レポーター	エフェクター GUS 活性 (pM 4-MU/min/mg protein)		
	-	+RISBZ1	+Opaque2
1x12bpGCN4	32±1.5	295±4.5 (9.2')	182±6 (5.6')
4x12bpGCN4	21	604±24.5 (28.7')	452±7.5 (21.5')
1x21bpGCN4	30±3	1318±55.5 (43.9')	1139±22.5 (37.9')
5x21bpGCN4	104	13222±1094 (127.1')	11932±22.5 (114.7')

レポーターとして 1x12bp, 4x12bp, 1x21bp and 5x21bp GCN4 motif/GUS 遺伝子を用いた。RISBZ1 (+ RISBZ1)および Opaque2(+ Opaque2)遺伝子の発現によって誘導された GUS 活性の値を示した。

[実施例 7] RISBZ1 タンパク質の結合サイト

本発明者らは以前に 02 はグルテリン遺伝子 GluB-1 プロモーターの-165 ~-160 の領域にある GCN4 モチーフ(TGAGTCA)を認識することを明らかにした(Wu C. Y. et al. Plant J. 14: 673-683, 1998)。メチレーション干渉実験によって、RISBZ1 タンパク質の GluB-1 遺伝子プロモーターにおける結合サイトを決定した。

GST-RISBZ1 融合タンパク質の発現、および精製は次のようにして行った。

RISBZ1 から 5 の cDNA のコード域をそれぞれ適当な制限酵素サイトが 5' 末端に付加されたプライマー (RISBZ1 ; BamHI-平滑末端、RISBZ2 ; BamHI-XhoI、RISBZ3 ; BamHI-SalI、RISBZ4 ; BamHI-SalI、RISBZ5 ; BamHI-XhoI) を用いて PCR 反応を行い増幅した。PCR 産物を制限酵素処理した後に、pGEX-4T-3(Amersham Pharmacia Biotech)のクローニングサイトに連結した。GST- RISBZ 融合タンパク質の発現の方法は鈴木らの論文(Suzuki A. et al. Plant Cell

Physiol. 39: 555-559, 1998)の記述に従った。アフィニティー精製された GST 融合タンパク質を、binding buffer (20mM HEPES-KOH pH7.9, 50mM KCl, 1mM EDTA and 10% glycerol)に対して4時間透析した。その後直ちに、-80°Cに保存した。

また、メチレーション干渉実験は、Weinberger ら(Weinberger J. et al. Nature 322: 846-849, 1986)の方法に従った。GluB1 5' 隣接域 (-245~+18) を Sall および BamHI で切断し、fill-in 反応によって、 $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP をもちいて末端標識した。さらに、この標識された断片をジメチルサルフェート処理に依ってメチル化し、GST- RISBZ1 と混合した後に保温した。非変性アクリルアミドゲル (5%, 0.25x TBE) によって、GST- RISBZ1 と複合体を形成した DNA 断片としなかったものに分画した。それぞれの DNA 断片を、DEAE セファロースカラムを用いて精製し、ピペリジンで切断したものを6%変性アクリルアミドゲルで分画した。

図7に示すように、GST-RISBZ1 タンパク質は GluB-1 プロモーターの-165 から-160 にかけての グアニン残基だけをプロテクトし、プロテクトされたグアニン残基は 02 の場合と一致した(Albani D et al. Plant Cell 9: 171-184, 1997)。-197 から+18 までの配列には ACGT モチーフ(A/G hybrid box)が含まれている(-79~-76)が、このモチーフのグアニン残基はプロテクトされなかった。

さらに、RISBZ1 タンパク質によって GCN4 モチーフが認識されるか否かについて調査するために、ゲルシフト分析を次のようにして行った。

GluB1 プロモーター領域 (-175~-155) の 21nt の配列に TCGA を付加した相補的な1組みのオリゴヌクレオチドをアニーリングし、fill-in 反応によって、 $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP をもちいて末端標識してプローブとした。変異型競合断片として、3塩基ずつずらして変異を加えた7組の相補的なオリゴヌクレオチドも合成し、アニーリングした。GST 融合タンパク質を用いたゲルシフト分析の方法は Wu ら(Wu C. Y. et al. Plant J. 14: 673-683, 1998)および鈴木らの論文(Suzuki A. et

al. Plant Cell Physiol. 39: 555-559, 1998)の記述に従った。標識されたプローブと 0.5 μ g の GST-RISBZ 融合タンパク質を混合し、室温で 20 分間保温した。競合実験ではこの混合液に 100 倍以上の分子量比の競合断片を加えた。この混合液を非変性アクリルアミドゲル (5%、0.25xTBE) を用いた電気泳動によって解析した。

GST-RISBZ1 タンパク質は GCN4 モチーフを含む 21 bp の DNA 断片に結合することが、シフトバンドが検出されたことによって示された(図 8B)。さらに、図 8A に示しているような 3bp づつ変異が加えられた 21 bp の DNA 断片をコンペティターとして加えた実験を行った。GCN4 モチーフに変異が加えられた DNA 断片をコンペティターとして加えた場合には、プローブとして加えられた DNA 断片の結合を全くあるいはほとんど阻害しなかった(図 8B-F)。一方、GCN4 モチーフの隣接配列に変異が加えられた DNA 断片をコンペティターとして加えた場合にはシフトバンドが消失した(図 8B-F)。従って、GCN4 モチーフの変異が RISBZ1 タンパク質の結合に顕著に影響を及ぼすことから、RISBZ1 タンパク質は GCN4 モチーフを特異的に認識することが明らかとなった。同様な実験は、他の RISBZ タンパク質についても行い、これらも GCN4 モチーフを特異的に認識することが判った。図 8B-F から判るように、それぞれのタンパク質は GCN4 モチーフへの親和性がわずかに異なる。RISBZ2 および RISBZ5 において、GCN4 モチーフの隣接配列に変異が加えられた DNA 断片をコンペティターとして加えた場合にシフトバンドが完全に消失しない(図 8C, F)。

以上の結果から、RISBZ タンパク質は、親和性は異なるが、GCN4 モチーフを特異的に認識することが明らかになった。

【実施例 8】 RISBZ1 のヘテロダイマー形成能

bZIP 型転写因子である RISBZ1 は、他の RISBZ タンパク質とヘテロダイマーを形成して GCN4 様モチーフと結合し機能する可能性がある。RISBZ2 および RISBZ3

と RISBZ1 との間においてヘテロダイマーを形成するか否かを調査した。コムギ胚芽抽出液を用いて完全長 RISBZ1 タンパク質および short-form-RISBZ2 (sRISBZ2), -RISBZ3 (sRISBZ3) タンパク質を調製し(図 9A)、DNA 結合実験を試みた。in vitro 翻訳は次のようにして行った。RISBZ1 cDNA のコード域、RISBZ2 cDNA および RISBZ3 cDNA の bZIP ドメインコード域を NcoI サイトが 5' 末端に付加されたフォワードプライマーおよび終止コドンと BamHI サイトが付加されたりバースプライマーを用いて増幅した。プライマーの塩基配列は以下の通りである。

- ・ RISBZ1, R1F : 5' - AAACCATGGAGCACGTGTTCCGCGT -3' (配列番号 : 46)、
BRIS1r : 5' - TAGGATCCGCTCCTACTACTGAAGCT -3' (配列番号 : 47)
- ・ sRISBZ2, dR2-1 : 5' - AAACCATGGAGGGAGAAGCTGAGACC -3' (配列番号 : 48)、
R2ra1 : 5' - AAAGGATCCTACATATCAGAAGCGGCGGGA -3' (配列番号 : 49)
- ・ sRISBZ3, dR3-1 : 5' - AAACCATGGATATAGAGGGCGGTCCA -3' (配列番号 : 50)、
R3ra1 : 5' - AAAGGATCCTACAGCCCGCCCAGGTGGCCG -3' (配列番号 : 51)

PCR 反応は、PCR 反応混合液(10mM Tris-HCl pH8.3、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、0.01%(W/V)ゼラチン、200μM dNTPs、1μM プライマー、鋳型 DNA 0.5 mg、2.5 unit TaqI ポリメラーゼ)を、94°Cで1分/50°Cで1分/72°Cで2分を30サイクルで行った。

PCR 産物を NcoI および BamHI で切断したのちに pET8c(Novagen)に繋いだプラスミドを構築した。これらのプラスミドを鋳型とした in vitro 転写/翻訳 (TNT coupled wheat germ extract systems; Promega)反応によって全長 RISBZ1 および truncated form RISBZ2 (RISBZ2s)、RISBZ3(RISBZ3s)を産生させた。ゲルシフト分析には反応後のコムギ胚芽抽出液 4μl を用いた。

21 bp GCN4 モチーフに結合したホモダイマーとヘテロダイマーを区別するためにゲルシフト分析を行った。RISBZ1 と sRISBZ2 および sRISBZ3 を前もって保温した後にプローブ (GCN4 モチーフ) を反応させた結果、ホモダイマーに加えてヘテロダイマーが GCN4 モチーフに結合することが示された(図 9B)。すなわち、

RISBZ1 タンパク質は他のメンバーとヘテロダイマーを形成できることが分かった。

〔実施例 9〕 RISBZ1 タンパク質の N 末端領域の転写活性化に対する関与

RISBZ1 タンパク質の転写活性化ドメインを同定するためにトランジェントアッセイを行った。3 コピーの 21 bp GCN4 モチーフと CaMV35S のコアプロモーター配列が連結された GUS 遺伝子をレポーターとして用意した。CaMV35S プロモーターで RISBZ1 タンパク質の様々なドメインを発現させ、これらがレポーター遺伝子を活性化させるか否かを調査した。

N 末端から塩基性ドメインまでにかけて 40 アミノ酸ずつ欠失させた RISBZ1 タンパク質（配列番号：2 のアミノ酸配列において 41～436、81～436、121～436、161～436、201～436 番目および 235～436 番目のアミノ酸までの領域）をコードするエフェクタープラスミドのシリーズを作成した。完全長の RISBZ1 タンパク質をコードするエフェクタープラスミドとレポータープラスミド（4 コピーの 12 bp GCN4 モチーフと CaMV35S のコアプロモーター配列が連結された GUS 遺伝子）をプロトプラストに導入すると、レポータープラスミドを単独で導入した場合よりも約 30 倍の GUS 活性が検出された。このレポーター遺伝子の転写活性を 100% とした場合、最初の 40 アミノ酸の欠失によってレポーター遺伝子の活性は 20% まで低下する。さらに 40 アミノ酸ずつ欠失させることによって、徐々に 10% までレポーター遺伝子の活性が低下した。すなわち、主として N 末端から 40 アミノ酸までの領域が転写活性化に関与することが示唆された。

この N 末端側の 40 アミノ酸と RISBZ1 の転写活性化能との関わりをさらに調べるために、酵母の転写活性化因子 GAL4 の DNA 結合ドメインと、RISBZ1 タンパク質の様々な領域との融合タンパク質を発現させることによって gain-of-function 解析を試みた。図 10 に示すように、CaMV35S プロモーターの下流に GAL4-DNA 結合ドメインと RISBZ1 の各領域との融合タンパク質のコード配列を繋いだプラスミドをエフェクターに用いた。それぞれのエフェクタープラスミドと

43

レポーター（9コピーの GAL4-DNA 結合サイトと CaMV35S のコアプロモーター配列が連結された GUS 遺伝子）をプロトプラストに導入した。

GAL4-DNA 結合ドメインと RISBZ1 の 1～235 番目のアミノ酸までの領域の融合タンパク質とこの融合タンパク質を C 末端側から RISBZ1 における 27 番目のアミノ酸の位置まで段階的に欠失させたシリーズとの間で転写活性化能に大きな差異は見出されなかった(図 10)。さらに RISBZ1 の 20 番目のアミノ酸の位置まで欠失させると活性化能は著しく低下した(図 10)。また、RISBZ1 の N 末端側の 8 アミノ酸を欠失させた場合でもレポーターの転写活性は消失した。一方、RISBZ1 の他の領域（配列番号：2 のアミノ酸配列において 27～57 番目、81～234 番目、161～234 番目および 235～436 番目のアミノ酸までの領域）と GAL4-DNA 結合ドメインの融合タンパク質はレポーター遺伝子の転写活性に影響を与えなかった。従って、RISBZ1 タンパク質は酸性ドメインよりむしろ N 末端側の 27 アミノ酸に含まれるプロリンリッチドメインが転写の活性化に関与していることが示唆された。

〔実施例 10〕 ドメインスワッピング実験による、RISBZ1 と他の RISBZ タンパク質ファミリーメンバーとの転写活性化能の違い

BISBZ タンパク質ファミリーのメンバーはいずれも、GCN4 モチーフに対する同程度の親和性を備えているが、RISBZ1 だけが転写活性化能を有する。このような差異をもたらす原因を明らかにするために、RISBZ1 と RISBZ2 および RISBZ3 タンパク質との間でドメインスワッピング実験を行った。bZIP ドメインより上流の N 末端領域を、RISBZ1 (1～299)と RISBZ2 (1～229)および RISBZ3(1～137)との間で交換した。

RISBZ1 の N 末端領域と RISBZ2 および RISBZ3 の DNA 結合ドメインの組み合わせでは、完全長の RISBZ1 と比較しておよそ 15%および 38%の転写活性化能を示した。一方、RISBZ2 および RISBZ3 の N 末端領域を RISBZ1 の DNA 結合ドメインに

4 4

連結させた場合には、RISBZ1 の DNA 結合ドメインだけで誘導される転写レベルをわずかに上回る程度にとどまった。

これらの結果から、転写の活性化には主として N 末端領域が関わっていること示された。RISBZ2 および RISBZ3 の転写活性化能が低い理由として、RISBZ1 の転写活性化ドメインに相当する領域が進化の過程で欠失あるいは変異を起こした可能性が挙げられる。または、転写活性化ドメイン形成の過程にあるということも考えられる。RISBZ3 に関しては RISBZ1 から見出されたプロリンリッチドメインを完全に失っていることが原因として挙げられる。同様のことは RISBZ4 および 5 についても当てはまる。他の解釈として、GCN4 モチーフに対する親和性の差異によって転写活性化能の違いがもたらされるという解釈も考えられるが、ゲルシフト解析からこの可能性は否定され则认为られる。

RISBZ1 から見出されたプロリンリッチドメインは、RISBZ2 においても高度に保存されているにも拘わらず、RISBZ2 の転写活性化能は RISBZ1 と比較してきわめて低かった。このドメインを含む RISBZ2 の N 末端側の 27 アミノ酸と GAL4-DNA 結合ドメインを融合させたタンパク質をコードするエフェクタープラスミドと GCN4 モチーフ-GUS レポーター遺伝子をプロトプラストに導入しても、GUS 活性の上昇は観察されなかった。

RISBZ1 および RISBZ2 の N 末端の 27 アミノ酸領域では変異が 8 個のアミノ酸に限られており、いづれの変異が転写活性化能の著しい差異をもたらしているのか同定することを試みた。RISBZ2 と異なる RISBZ1 の 8 個のアミノ酸を 1 つずつ RISBZ2 と一致するように置換させたタンパク質の N 末端の 40 アミノ酸領域と、GAL4-DNA 結合ドメインを融合させたタンパク質をコードするエフェクタープラスミドと GCN4 モチーフ-GUS レポーター遺伝子を、プロトプラストに導入した。8 種のエフェクターの中で RISBZ1 の N 末端側から 7 番目のアミノ酸を置換したタンパク質をコードするエフェクターを除いた全てが、レポーター遺伝子の転写を活性化させることができなかった。転写活性化能を喪失させた 7 つのアミノ酸

置換はいずれもハイドロパシーパターンの変化を引き起こすことが Kyte and Doolittle の計算式で予測された(図 1 1)。

[実施例 1 1] 転写因子 RISBZ1 の育種的利用

活性化能を有している転写因子 RISBZ1 を育種的に利用できるか否かを調査した。該転写因子を種子中で特異的に過剰発現させるために、種子貯蔵タンパク質遺伝子のイネ 13kD プロラミンプロモーターの制御下で過剰発現させた形質転換体イネを作出した。方法として RISBZ1 の翻訳開始点から上流-29 の EcoRI サイトから poly(A)結合サイトまでを含む領域をプロラミンプロモーター-652~ATG より-13 の領域を連結し、pGTV-Bar のバイナリーベクターに挿入して、アグロバクテリアを介して、イネに遺伝子を導入した。28 系統の独立した形質転換体を作成した。RISBZ1 を過剰発現しているイネのスクリーニングは登熟期の種子から RNA を抽出し、RISBZ1 の cDNA をプローブにして、ノーザンハイブリダイゼーションで行った(図 1 2)。この RISBZ1 を高発現している系統を用いて、既に作出してある RISBZ1 の標的配列である 21bp の GCN4 モチーフを含む配列(5'-GTTTGTTCATGGCTGAGTCATG -3' / 配列番号: 5 2)を 5 個直列状に連結したものをミニマムプロモーター/GUS レポーターにつないでイネに遺伝子導入した形質転換体イネと交配した。

その結果、GUS レポーター遺伝子の GUS 活性は、RISBZ1 の過剰発現により、発現レベルがコントロールの 5×GCN4 の系統(11~14 nmol/min/mg protein)に比べて 400 倍以上(450~750 nmol/min/mg protein)に高まることが明らかになった(図 1 2)。これらの結果から、外来遺伝子を RISBZ1 の標的配列の下流につなげれば、活性化能を有する転写因子の過剰発現により高度に転写を活性化できるものと推察できる。

また、RISBZ1 はグルテリン遺伝子のみならず他の貯蔵タンパク質遺伝子も活性化することができる。35S CaMV プロモーター/RISBZ1 を、グルテリンプロモ-

46

ター/GUS、グルテリンプロモーター(-980~ATG)/GUS、および 13K プロラミンプロモーター(-652~-29)/GUS と共に、イネプロトプロストにエレクトロポレーションで遺伝子導入し、一過的発現を調べた。

その結果、RISBZ1 はこれらのプロモーターの GCN4 モチーフを含む標的配列に結合し、転写を活性化した。13kd プロラミンプロモーターに関してはバックグラウンドに比較して 5~10 倍、グロブリン遺伝子に関しては 20~30 倍転写を活性化していることが明らかになった。そこで、これらの遺伝子に関して、配列が RISBZ1 によってどのように認識されているのかを、メチレーション干渉実験によって調べた。

その結果、プロラミン遺伝子においては数ヶ所の GCN4 モチーフ(TGACACA, GATGACTCA, TGACTCAC))がグロブリン遺伝子においては、GCN4 モチーフとは異なる配列 (GGTGACAC, GTATGTGGC, GATCCATGTCAC) が認識されていることが示された。そこでさらに、RISBZ1 がどのような配列を特異的に認識するか G, A, C, G/C, A/G, C/A, GCN4, 22kd zein 結合サイト、b-32 結合サイトを含む 12bp の 4 回の直列配列を-46 CaMV 35S コアプロモーター/GUS のレポーター遺伝子につないで、一過的発現で認識を調べた。その結果 RISBZ1 は、G/C box および GCN4 モチーフをより優先的に認識していることが明らかになった (図 13)。

さらに、多くの貯蔵タンパク質に見られる GCN4 モチーフを用いて同様に RISBZ1 による活性化能を調べた。その結果、GCN4 モチーフのコア配列(TGAGTCA)の隣接配列が活性化能に影響を及ぼすこと、コムギのグリアジン遺伝子、およびライムギのセカリン遺伝子の GCN4 モチーフが、活性化能が高いことが明らかになった (図 14)。

産業上の利用の可能性

本発明により、イネ種子貯蔵タンパク質の発現を調節する新規転写因子、および該転写因子をコードする遺伝子が提供された。転写活性化能を有する本発明の

47

RISBZ1 タンパク質を細胞内へ導入し過剰発現させることにより、該タンパク質によって制御を受ける多くの種子貯蔵タンパク質群の発現を高めることが期待できる。また本発明は、本発明の転写因子を利用した、有用な外来遺伝子（抗体、酵素等）を高度に発現させるための新しい遺伝子発現系を提供する。すなわち、転写因子との結合を容易にするため、転写因子の認識配列(GCN4 モチーフ)を直列状に連結し、ある種の貯蔵タンパク質のプロモーターに導入することにより、この改変したプロモーターの制御下に位置する貯蔵タンパク質、および外来有用遺伝子の発現を高めることができる。これにより、胚乳中の種子貯蔵タンパク質が高度に蓄積し、より栄養価が高い種子（例えば、コメ）の生産、および有用タンパク質が高度に蓄積した種子の生産が大いに期待される。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA。

(a) 配列番号：2、5、または7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1、3、4、または6のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：2、5、または7のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2、5、または7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1、3、4、または6のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：2、5、または7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

2. GCN4 モチーフと結合する機能、またはイネ種子貯蔵タンパク質の発現を活性化する機能を有するタンパク質をコードする、請求項1に記載の DNA。

3. イネ由来である、請求項1または2に記載の DNA。

4. 請求項1から3のいずれかに記載の DNA の転写産物と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA。

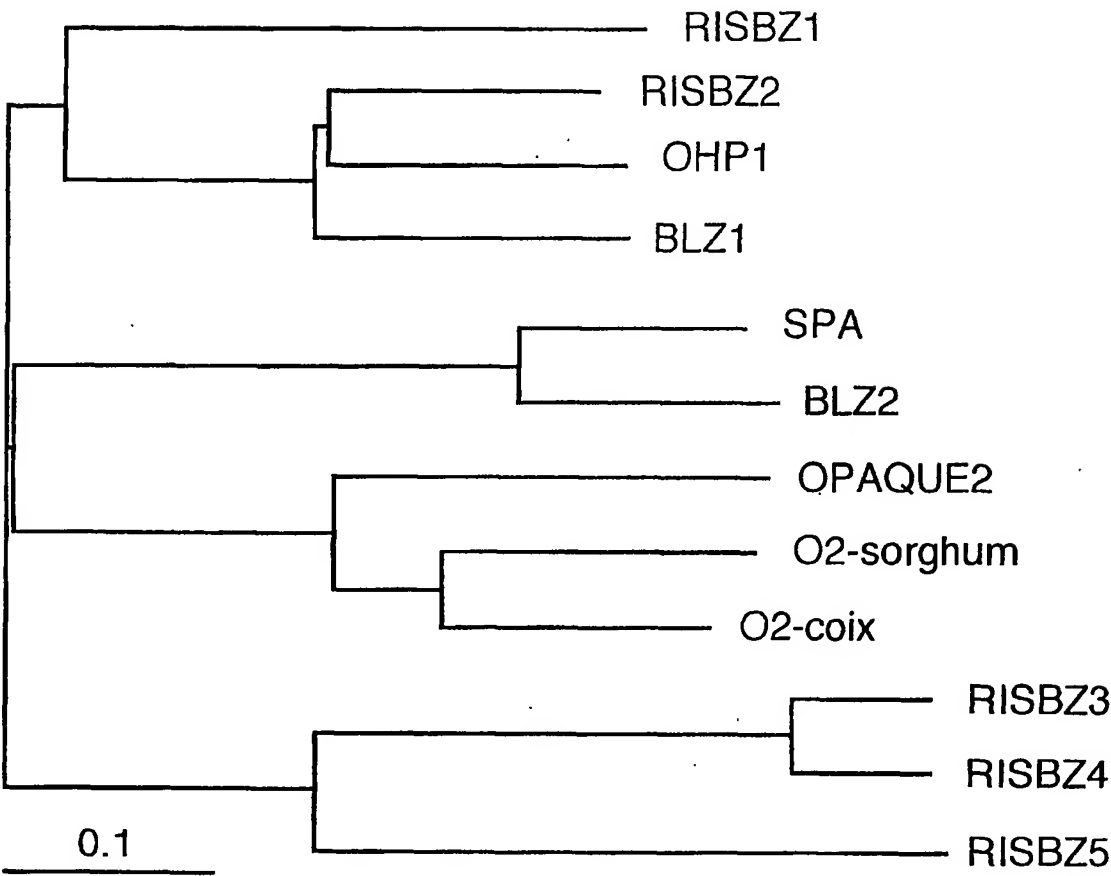
5. 請求項1から3のいずれかに記載の DNA の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA。

6. 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、請求項1から3のいずれかに記載の DNA の発現を抑制させる RNA をコードし、請求項1から3のいずれかに記載の DNA と 90%以上の相同性を有する DNA。

7. 植物細胞における内在性の請求項 1 から 3 のいずれかに記載の DNA がコードするタンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有するタンパク質をコードする DNA。
8. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の DNA を含むベクター。
9. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の DNA または請求項 8 に記載のベクターを保持する形質転換細胞。
10. 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の DNA によりコードされるタンパク質。
11. 請求項 9 に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 10 に記載のタンパク質の製造方法。
12. 請求項 4 から 7 のいずれかに記載の DNA を含むベクター。
13. 請求項 1 から 7 のいずれかに記載の DNA または請求項 8 若しくは 12 に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。
14. 請求項 13 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。
15. 請求項 14 に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。
16. 請求項 14 または 15 に記載の形質転換植物体の繁殖材料。
17. 請求項 10 に記載のタンパク質に結合する抗体。
18. 発現制御領域の下流に請求項 1 に記載の DNA が機能的に結合した DNA 構築物、および請求項 10 に記載のタンパク質の標的配列を有する発現制御領域の下流に外来遺伝子が機能的に結合した DNA 構築物をゲノム上に有する植物体。
19. 標的配列が GCN4 モチーフを含む配列である請求項 18 に記載の植物体。
20. GCN4 モチーフが配列番号：8、13、または 14 のいずれかに記載の配列である請求項 19 に記載の植物体。
21. 標的配列が G/C ボックスを含む配列である請求項 18 に記載の植物体。

22. 発現制御領域の下流に請求項1に記載のDNAが機能的に結合したDNA構築物をゲノム上に有する植物体、および請求項10に記載のタンパク質の標的配列を含む発現制御領域の下流に外来遺伝子が機能的に結合したDNA構築物をゲノム上に有する植物体を交配させることを特徴とする、請求項18から21のいずれかに記載の植物体の作出方法。

図 1



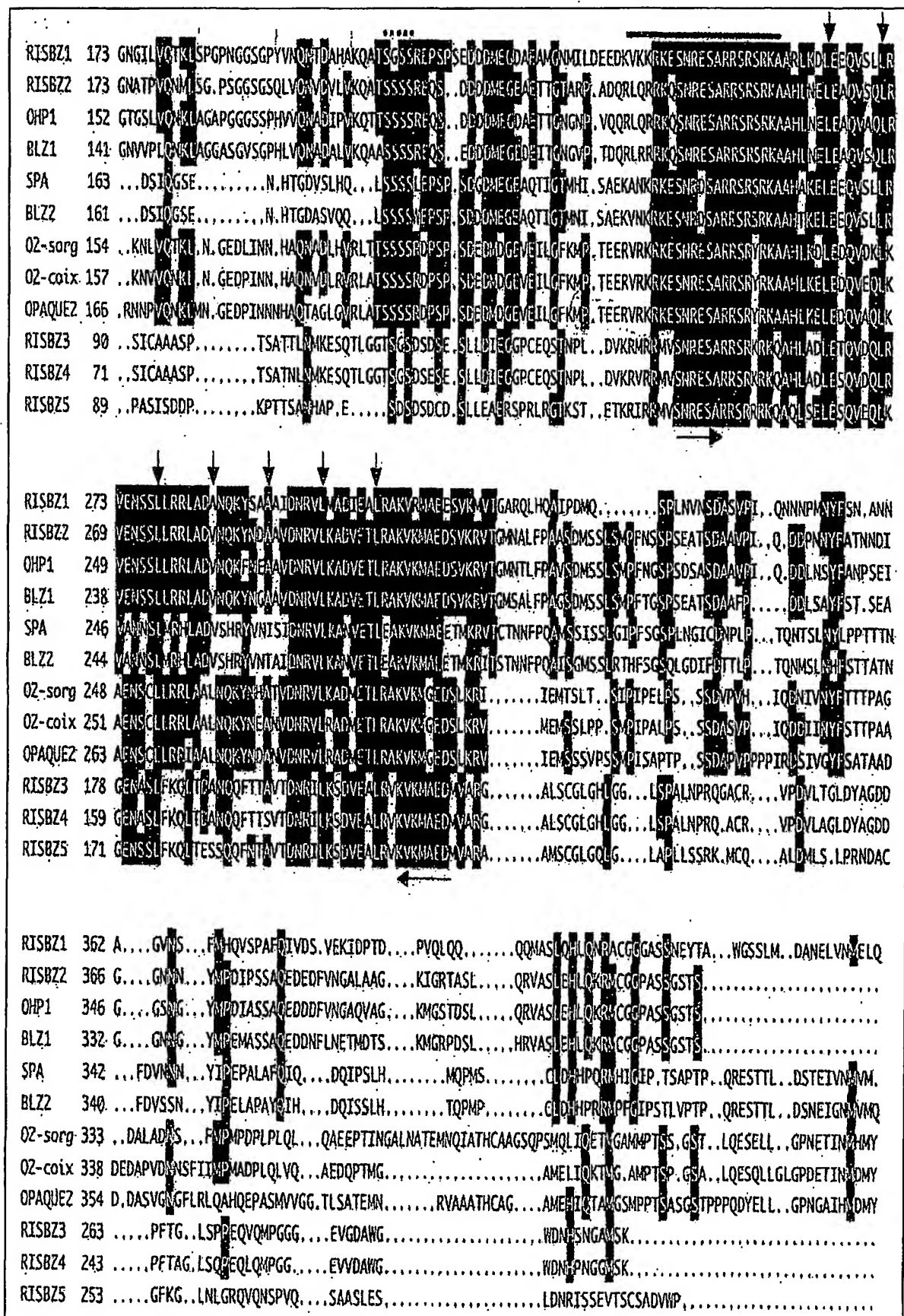
2 / 14

2

RISBZ1	1	MEVFVDEIPDPLNAPP...PV...QPAAAAGVDDVAVSGGG.....LLE.....RCPSEWYFQKFLLELDGVPAPASPDAATYPS
RISBZ2	1	NERVFSVEETSDPFVPP...PP...QSAAAQGGGGVAGGGGGVAGGGGG...NAN...RCPSEWYFQKFLLE.....AVLDS
OHP1	1	NERVFSVEETPNPYVPP...HP...QSAAAGAVAPAGEAA...LN...RCPSEWYFQKFLLE.....AVLDS
BLZ1	1	NERVFSVEETDPFHGP...SPRQGRRPPE...AVN...RCPSEWYFQKFLLE.....AVLDS
SPA	1	MEVFSLEAMPEPSN...PC...RTSSPPEA...HMLVAGL...GG...VAG...EVGGCATNECATWCFQKFLVDPWLLN...VPTAPVAP
BLZ2	1	MEVFSLEAMPEPSN...PG...RTSPPOQA...HVLASVVRGAGG...VVG...ETVG...DGATELQFKSMEEPSSLN...VPTAPVAP
OZ-sorg	1	MEVFSVEETLQFHOLDPSPPLPE...PE...QOPLVIGTSSWIDVYTHGG...NCG...SNM...QOI...QNTTETTERLEELT...DTPVANS
OZ-coix	1	MEVFSVEETLQFHOLDPSPPLPE...QOPLVTDGTSWIDVYTHGG...GDMG...QNTTETTERLEELT...KITLVNS
OPAQUE2	1	MEVFSVEETLQFHOLL...PBPAPEREPPEVGT...TVG...SVIDVAA...AG...GDM...Q...QNTTETTERLEELT...TPPVVVPNS
RISBZ3	MK.....KCPSELNFAFFHGE.....RGEDAD
RISBZ4	MDI...FTHGG.....SGGAD
RISBZ5	MK.....KCPSELNFAFFHGE.....AGADRK
RISBZ1	77	MPAAAAEAAARWSRYGORE...AVGVMPMAALPAAPASAAIPVEYHAILKRLLEDLAVAMHRAAGTHSESPLGNKTSLSIVGSLSSQKCI
RISBZ2	75	VPNPSPRAEAGGIRAGGVVP...VDVKPOLSAMAAATTSVAVDPVEYHAILKRLLEDLAVAMHRAAGTHSESPLGNKTSLSIVGSLSSQKCI
OHP1	61	VP...VAGVSRGSGVAG...VEAAERKTPGTAAASASSVVPVEYHAILKRLLEDLAVAMHRAAGTHSESPLGNKTSLSIVGSLSSQKCI
BLZ1	54	AAD...PSPMSGASRG...QAACRPRGAGTAGPVEYHAILKRLLEDLAVAMHRAAGTHSESPLGNKTSLSIVGSLSSQKCI
SPA	80	EAS.TLYPN.PTAEVSRKRPYDVHEMVGPEEVIPTPMA...PVPVPVAYHAILKRLLEDLAVAMHRAAGTHSESPLGNKTSLSIVGSLSSQKCI
BLZ2	78	DAS.TLHPN.PTAEVSRKRPYDVHEEVEVGIPTPMA...PVPVPVAYHAILKRLLEDLAVAMHRAAGTHSESPLGNKTSLSIVGSLSSQKCI
OZ-sorg	83	SCP.ALNVD.PVVEVDQA...MAPEAVS...AVGDPVEYHAILKRLLEDLAVAMHRAAGTHSESPLGNKTSLSIVGSLSSQKCI
OZ-coix	87	SCS.TLND.PVVEVDGT...MASCAVS...AVGDPVEYHAILKRLLEDLAVAMHRAAGTHSESPLGNKTSLSIVGSLSSQKCI
OPAQUE2	88	CCSGALNADRPVMEAVT...MAPAVSSAVGDPVEYHAILKRLLEDLAVAMHRAAGTHSESPLGNKTSLSIVGSLSSQKCI
RISBZ3	25	AAA...DQKPGGPH...PPAFMSAADLSSGFADSVTSTITGVIPNH...IWPQSQSLNARHPVYT...IESOS
RISBZ4	18	AD...H...PLGIFSAADLSSGFADSVTSTITGVIPNH...IWPQSQSLNARHPVYT...IESOS
RISBZ5	26	PGV...LS...PQGAR...KSLFSPGD.GEMSVLDQ...STLDGSGGCHLWHPESVTRTPPAAAFSATADERT

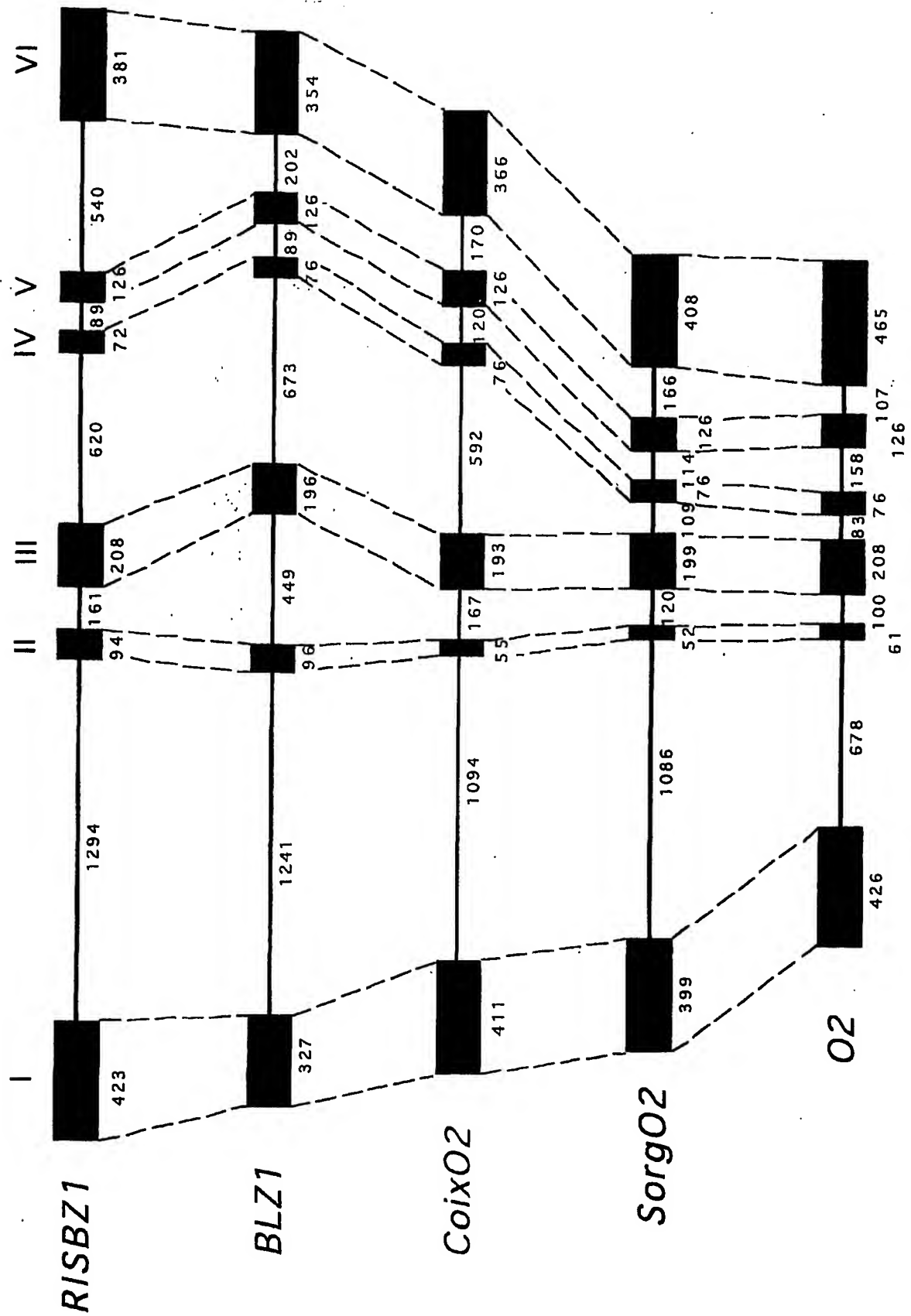
3 / 14

图 3



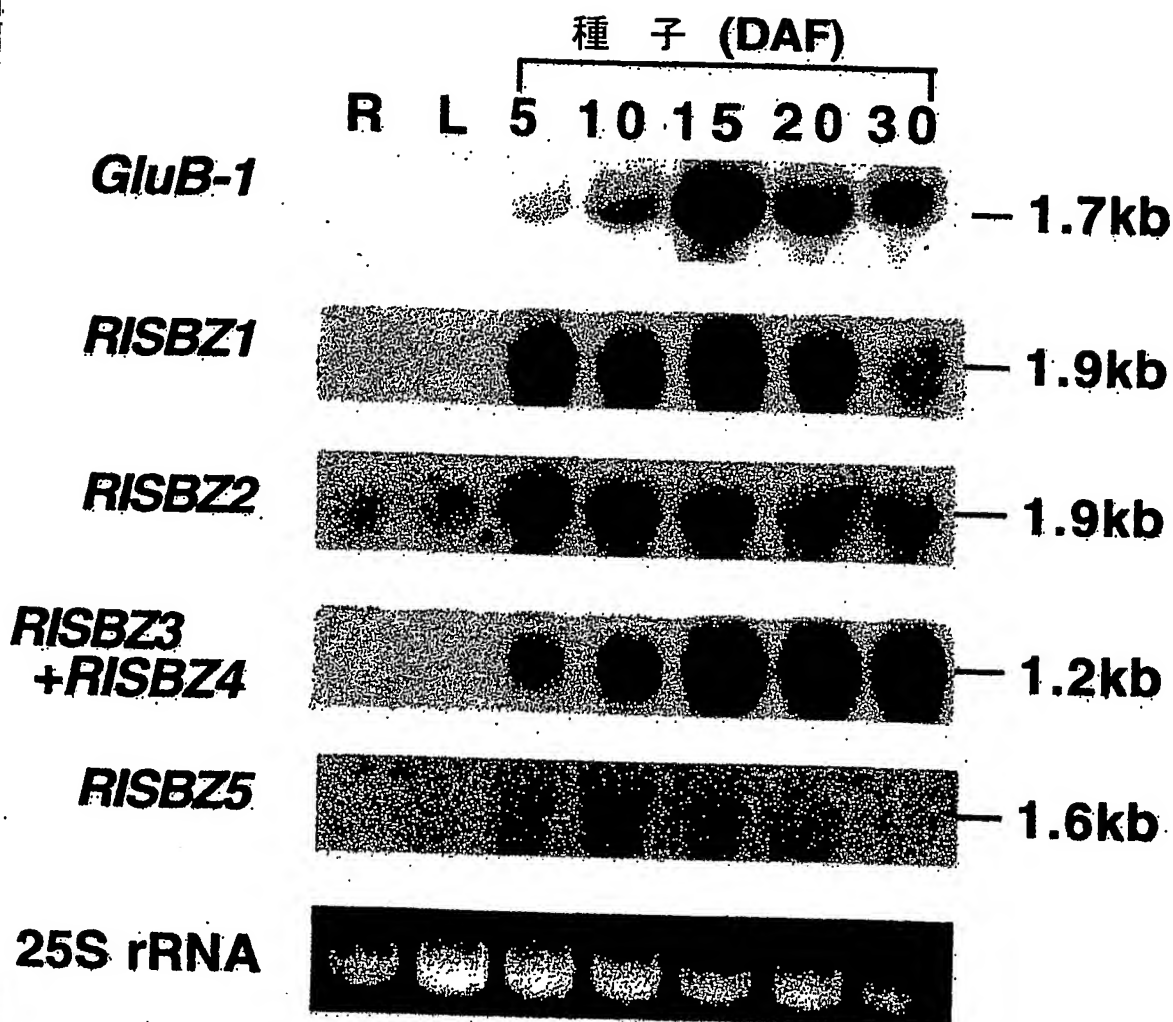
4/14

図 4



5 / 14

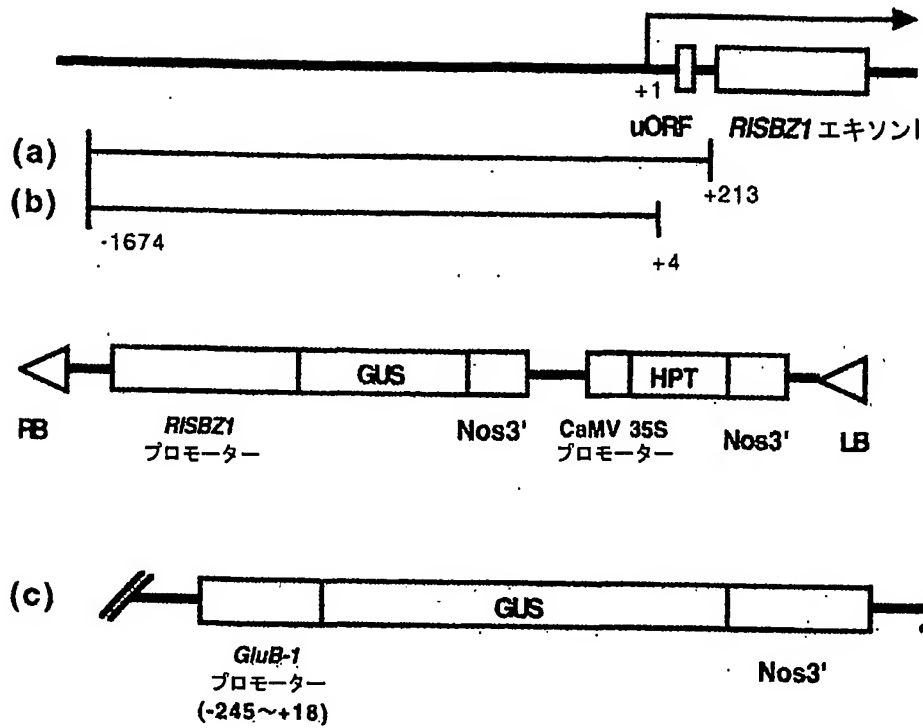
図 5



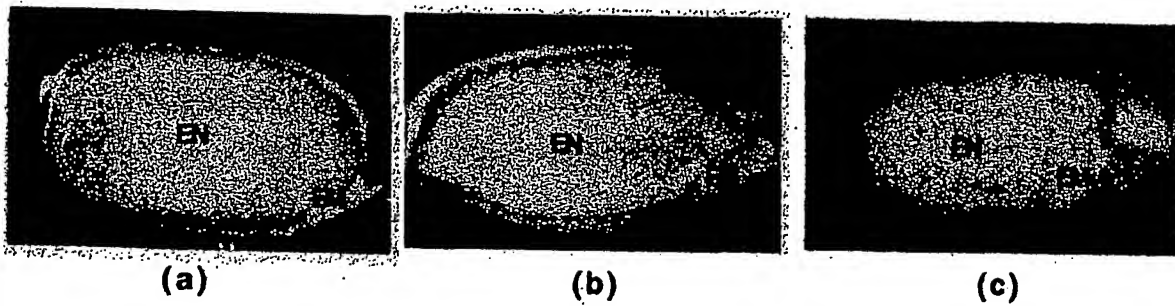
6 / 14

図 6

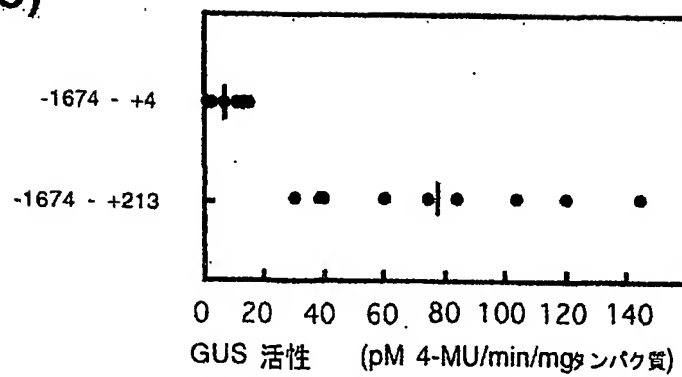
(A)



(B)

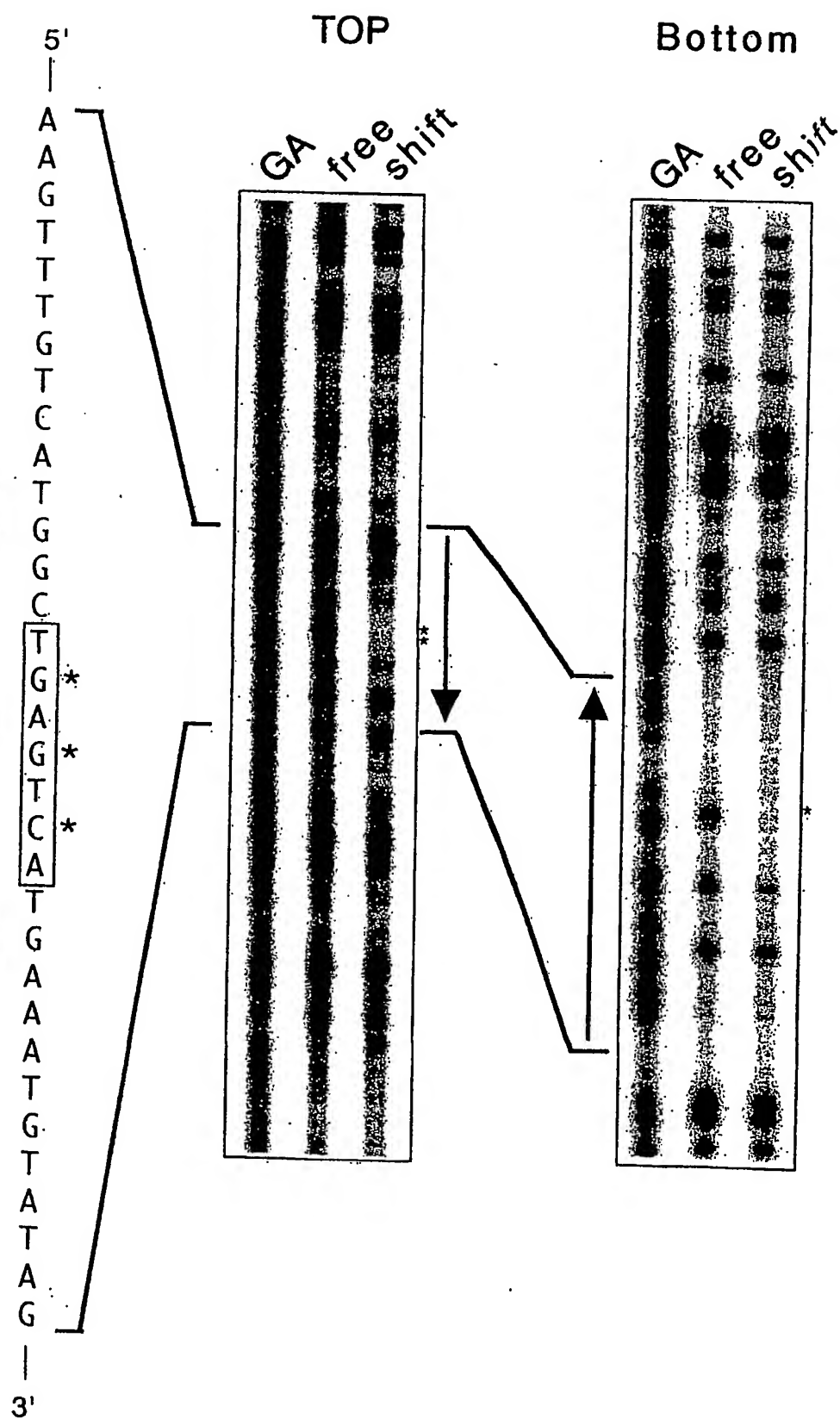


(C)



7/14

☒ 7



8/14

☒ 8

(A)

GCN4
WILD(W) GTTTGTCATGGCTGAGTCATG
M1 -GGA-
M2 -CGG-
M3 -CGT-
M4 -TAA-
M5 -TCC-
M6 -GAT-
M7 -AAG-

(B)

糖合物 W M2 M4 M6
- - M1 M3 M5 M7
タンパク質 - + + + + + + + + +



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

(C)

W M2 M4 M6
- - M1 M3 M5 M7
- + + + + + + + + +



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

(D)

W M2 M4 M6
- - M1 M3 M5 M7
- + + + + + + + + +



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

(E)

W M2 M4 M6
- - M1 M3 M5 M7
- + + + + + + + + +



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

(F)

W M2 M4 M6
- - M1 M3 M5 M7
- + + + + + + + + +

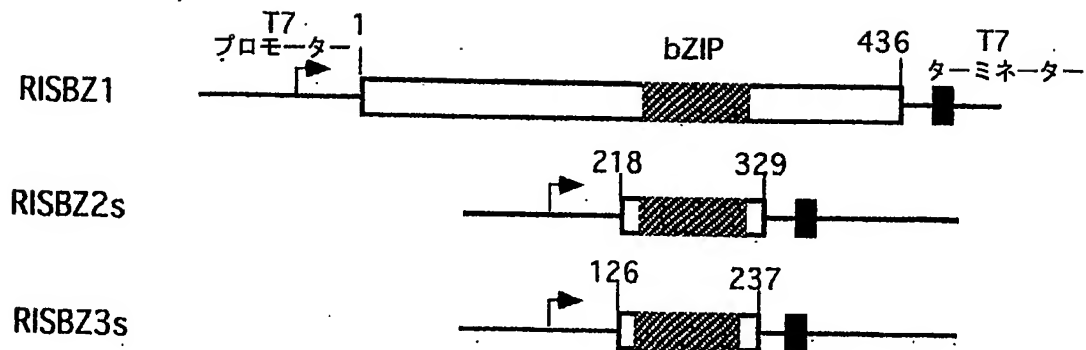


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

9 / 14

図 9

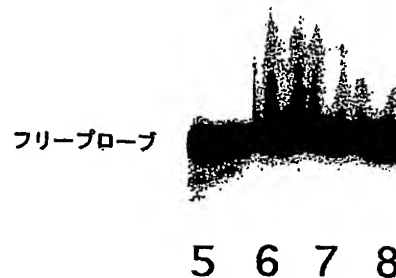
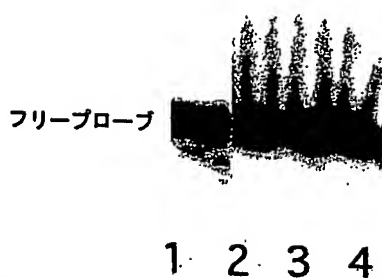
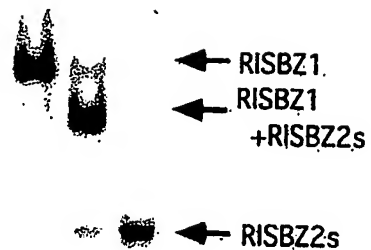
(A)



(B)

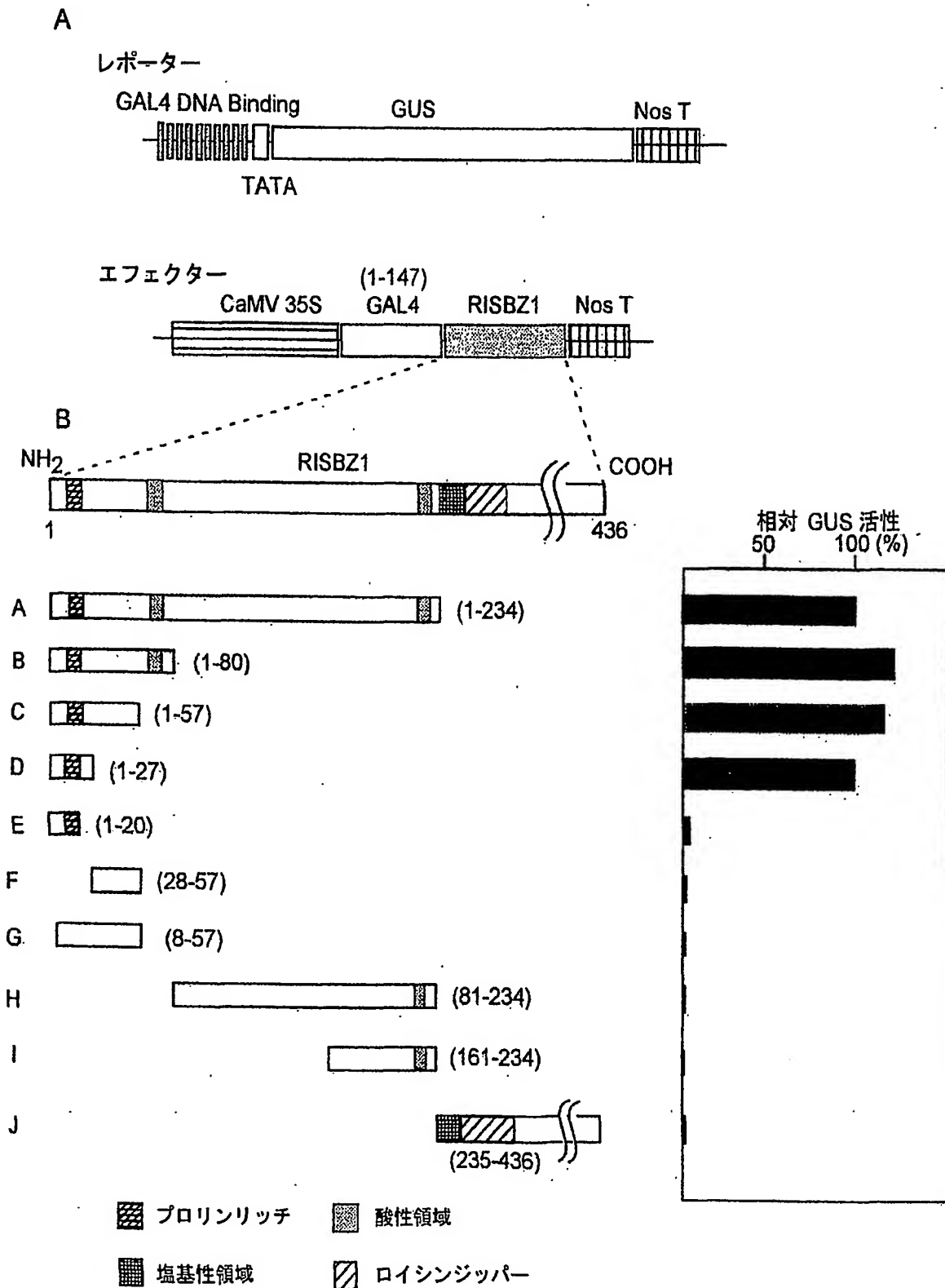
RISBZ1	-	+	+	-
RISBZ2s	-	-	+	+

RISBZ1	-	+	+	-
RISBZ3s	-	-	+	+



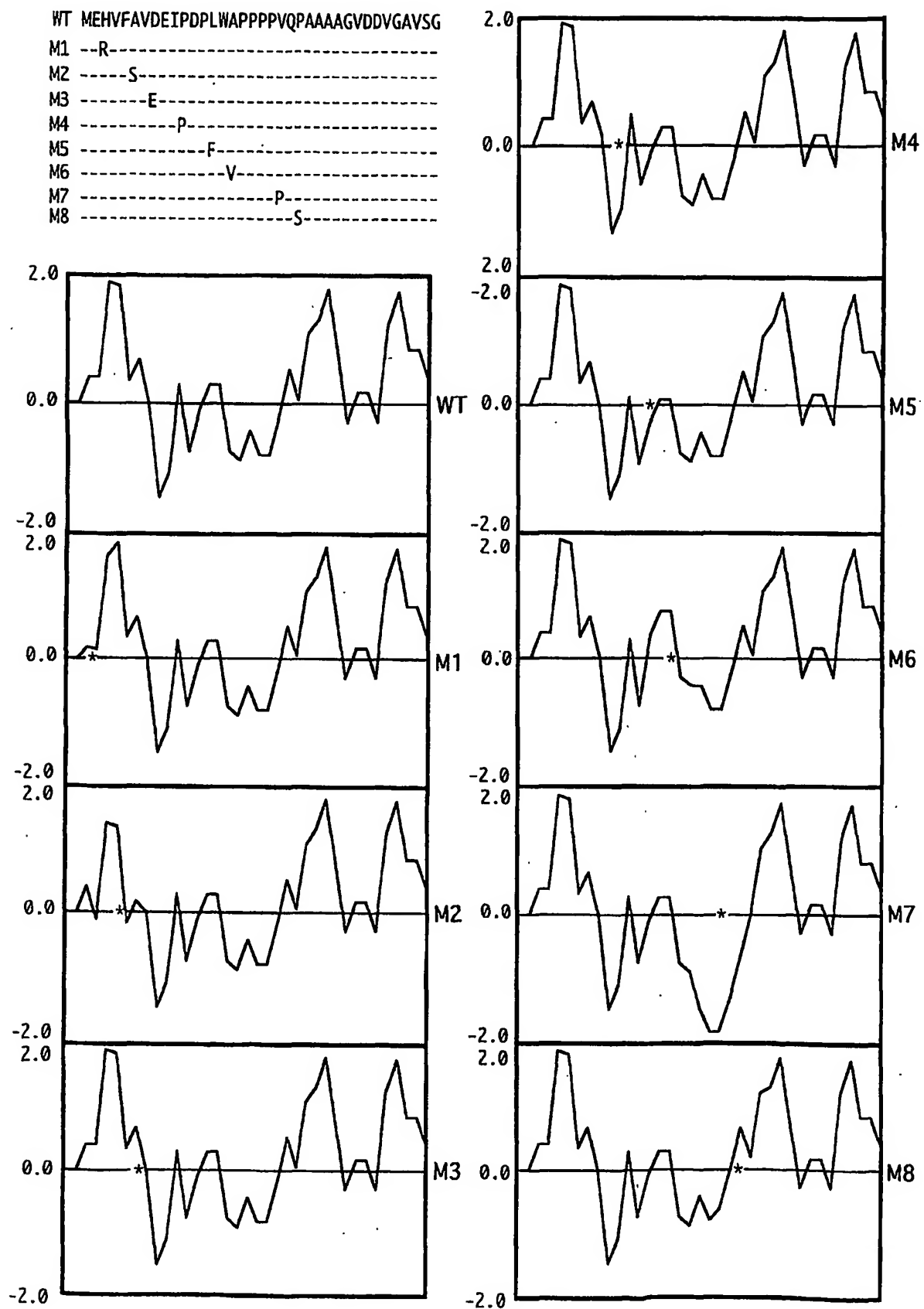
10/14

図 10



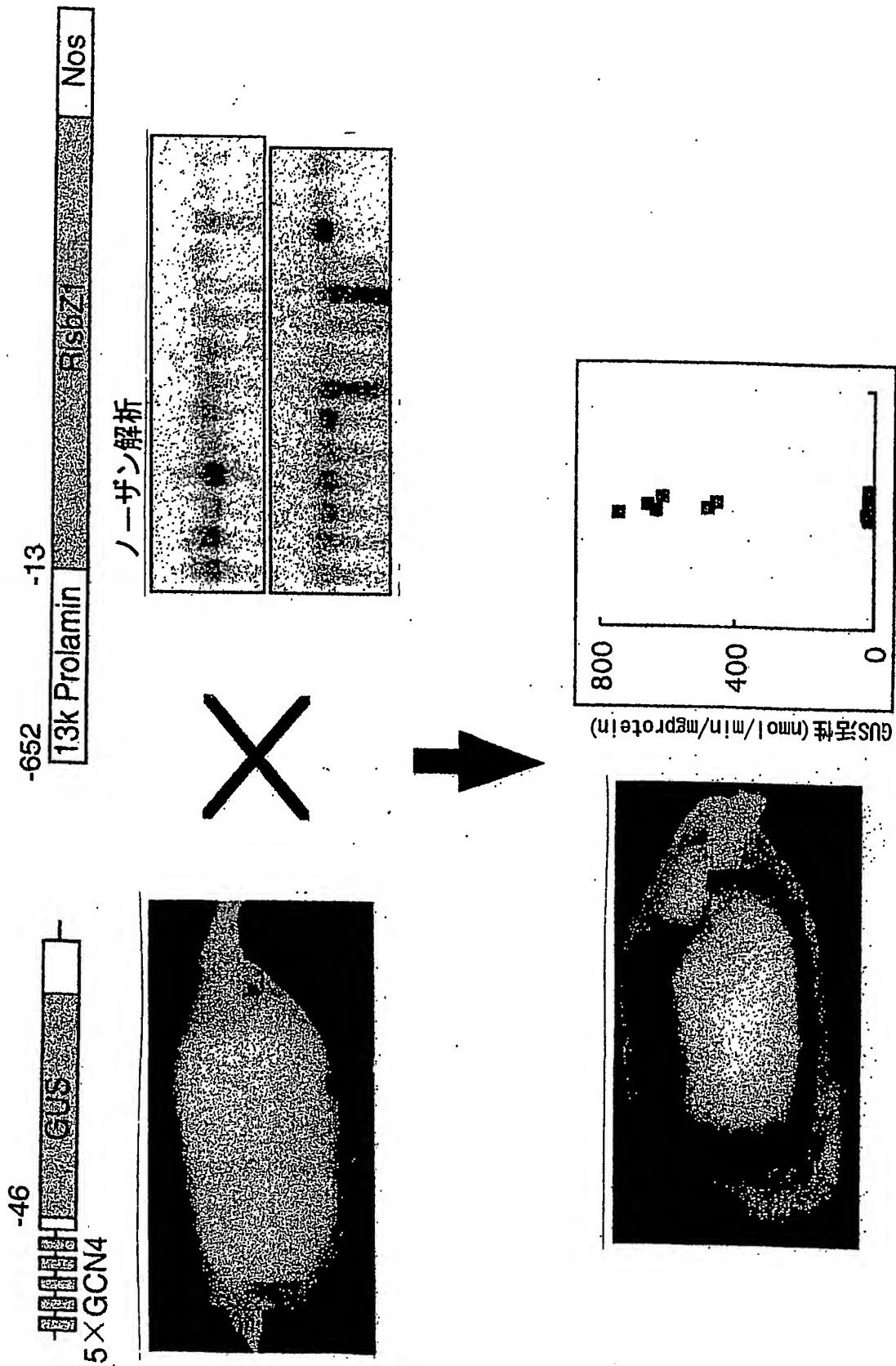
11/14

图 11



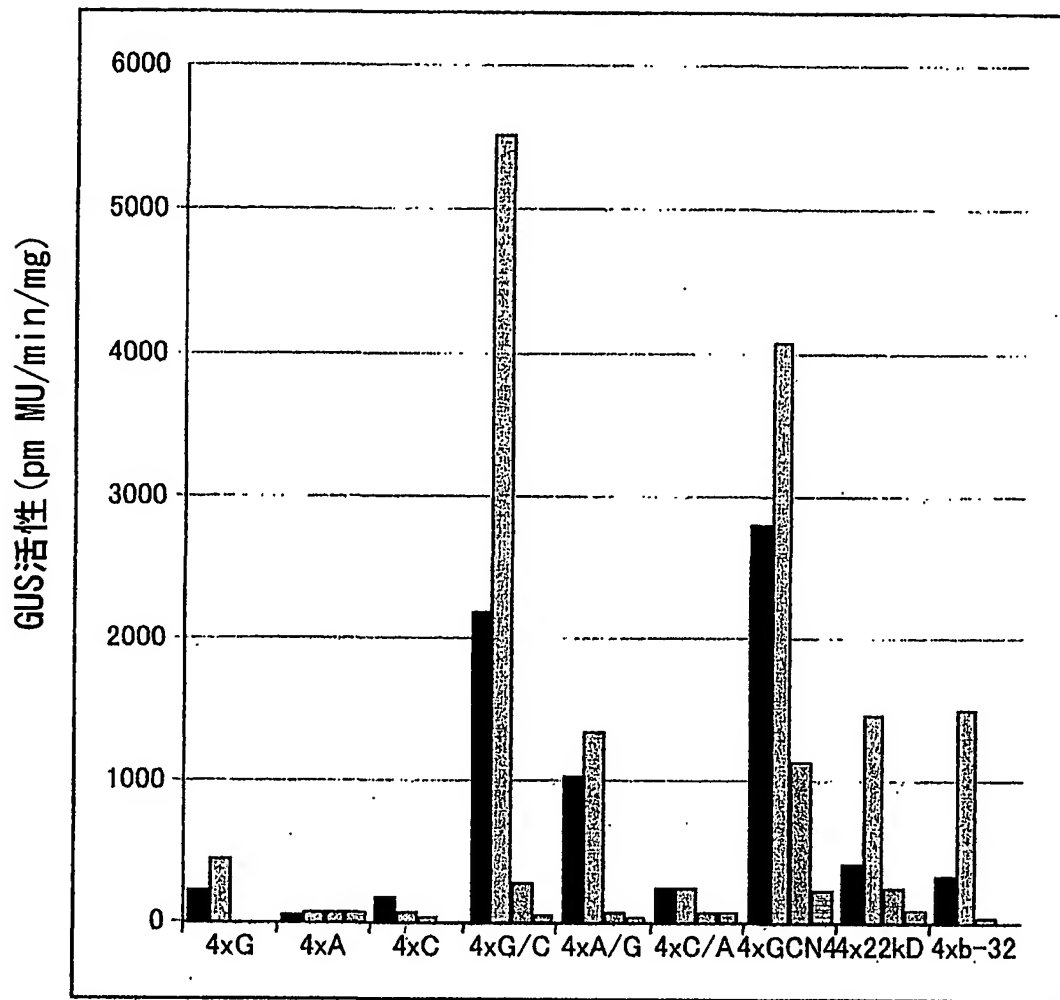
12/14

図 12



13/14

図 13

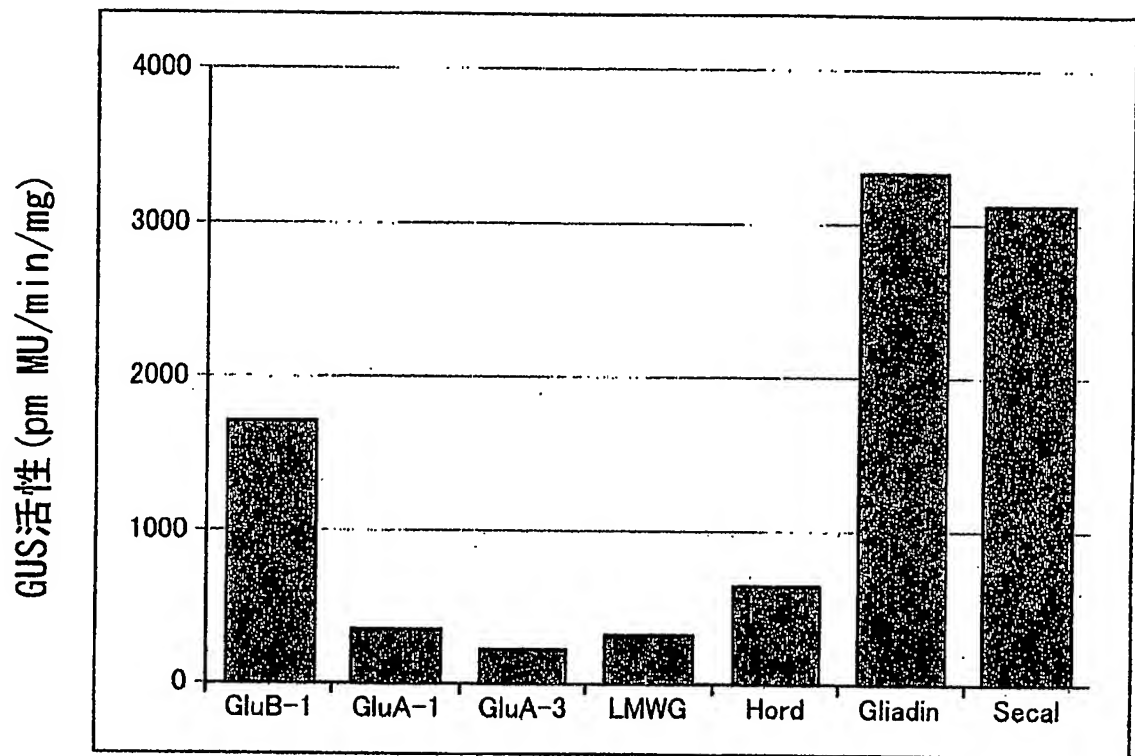


	RISBZ1		SPA
	Opaque 2		RISBZ3 (RITA1)

4xG	AGCCACGTGGCA
4xA	ACCTACGTAGGA
4xC	AGTGACGTCACA
4xG/C	AGCCACGTCACA
4xA/G	AGGTACGTGGCA
4xC/A	ACTGACGTAAGA
4xGCN4	GCTGAGTCATGA
4x22kD	TTCCACGTAGAT
4xb-32	GATGACATGGCT

14/14

図 14



GCTGAGTCATGA	GluB-1
CATGAGTCACTT	GluA-1
AGTGAGTCACTT	GluA-3
GGTGAGTCATAT	LMWG
GGTGAGTCATGT	Hordein
GATGAGTCATGC	Gliadin
AATGAGTCATCA	Secalin

1 / 5 2

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

<120> bZIP type transcription factors involved in expression of rice
storage protein gene

<130> MOA-A0003P

<140>

<141>

<150> JP 2000-311295

<151> 2000-10-11

<160> 52

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1735

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

2 / 5 2

<221> CDS

<222> (211)..(1518)

<400> 1

ggcagagaa aaaacccatg ggttgcgtag ccgtagcttt cccaccattt ccttctctcc 60

gaagcctcct cctctccgct tcctcccgcg aaaccaaatt ccaaagcatt tgategaatt 120

tctcccaaac tttccagcg ttttcaattt cgccccgatt tcggttcgaa aaccctcgc 180

gaattcattt caaactcgtc cgagagcgca atg gag cac gtg ttc gcc gtc gac 234

Met Glu His Val Phe Ala Val Asp

1

5

gag atc ccc gac ccg ctg tgg gct ccg ccg ccg ccg gtg cag ccg gcg 282

Glu Ile Pro Asp Pro Leu Trp Ala Pro Pro Pro Pro Val Gln Pro Ala

10

15

20

gcg gcc gcc gga gta gat gac gtc ggc gcg gtg agc ggc ggc ggg ttg 330

Ala Ala Ala Gly Val Asp Asp Val Gly Ala Val Ser Gly Gly Gly Leu

25

30

35

40

ctg gag cgg tgc ccg tcg ggg tgg aac ctc gag agg ttt ctg gag gag 378

Leu Glu Arg Cys Pro Ser Gly Trp Asn Leu Glu Arg Phe Leu Glu Glu

45

50

55

3 / 5 2

ctc gac ggc gtc cct gca ccg gcg gcg agc ccg gac ggc gcg gcg att 426

Leu Asp Gly Val Pro Ala Pro Ala Ala Ser Pro Asp Gly Ala Ala Ile

60

65

70

tac cct agc ccg atg ccg gcg gcg gcg gcg gag gcg gcg gcg cgc tgg 474

Tyr Pro Ser Pro Met Pro Ala Ala Ala Ala Glu Ala Ala Ala Arg Trp

75

80

85

agt agg ggc tac ggc gat cgt gag gcg gtg ggg gtg atg ccc atg ccc 522

Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Arg Glu Ala Val Gly Val Met Pro Met Pro

90

95

100

gcg gcc gcg ctt ccg gcg gcg ccg gcg agc gcg gcg atg gac ccc gtg 570

Ala Ala Ala Leu Pro Ala Ala Pro Ala Ser Ala Ala Met Asp Pro Val

105

110

115

120

gag tac aac gcg atg ctg aag cgg aag ctg gac gag gac ctc gcc acc 618

Glu Tyr Asn Ala Met Leu Lys Arg Lys Leu Asp Glu Asp Leu Ala Thr

125

130

135

gtc gcc atg tgg agg gcc tct ggt gca ata cat tct gag agt cct cta 666

Val Ala Met Trp Arg Ala Ser Gly Ala Ile His Ser Glu Ser Pro Leu

140

145

150

ggc aat aaa aca tca ctg agt ata gtt ggt tcc atc ctg agt tca cag 714

Gly Asn Lys Thr Ser Leu Ser Ile Val Gly Ser Ile Leu Ser Ser Gln

4 / 5 2

155

160

165

aag tgc att gaa ggt aac ggg ata cta gtg cag acc aag tta agt cct 762

Lys Cys Ile Glu Gly Asn Gly Ile Leu Val Gln Thr Lys Leu Ser Pro

170

175

180

ggc cca aat gga gga tca ggc cca tat gta aat caa aat aca gat gct 810

Gly Pro Asn Gly Gly Ser Gly Pro Tyr Val Asn Gln Asn Thr Asp Ala

185

190

195

200

cat gcc aag caa gct acg agt ggt tcc tca agg gag cca tca cca tca 858

His Ala Lys Gln Ala Thr Ser Gly Ser Ser Arg Glu Pro Ser Pro Ser

205

210

215

gag gat gat gat atg gaa gga gat gca gag gca atg gga aat atg atc 906

Glu Asp Asp Asp Met Glu Gly Asp Ala Glu Ala Met Gly Asn Met Ile

220

225

230

ctt gat gaa gaa gat aaa gtg aag aaa agg aag gaa tcc aac cgg gag 954

Leu Asp Glu Glu Asp Lys Val Lys Lys Arg Lys Glu Ser Asn Arg Glu

235

240

245

tca gct aga cgc tca aga agc aga aag gca gct cgc cta aaa gac ctg 1002

Ser Ala Arg Arg Ser Arg Ser Arg Lys Ala Ala Arg Leu Lys Asp Leu

250

255

260

5 / 5 2

gag gag cag gta tca cta tta agg gtt gaa aac tct tct ctg ttg agg 1050

Glu Glu Gln Val Ser Leu Leu Arg Val Glu Asn Ser Ser Leu Leu Arg

265 270 275 280

cgt ctt gct gat gca aat cag aag tac agt gct gct gct att gac aat 1098

Arg Leu Ala Asp Ala Asn Gln Lys Tyr Ser Ala Ala Ala Ile Asp Asn

285 290 295

agg gta cta atg gca gac att gaa gcc cta aga gca aag gtg agg atg 1146

Arg Val Leu Met Ala Asp Ile Glu Ala Leu Arg Ala Lys Val Arg Met

300 305 310

gca gag gag agt gtg aag atg gtt aca ggg gct aga caa ctt cac cag 1194

Ala Glu Glu Ser Val Lys Met Val Thr Gly Ala Arg Gln Leu His Gln

315 320 325

gcc att cct gac atg caa tct ccc ctc aat gtc aac tct gat gct tct 1242

Ala Ile Pro Asp Met Gln Ser Pro Leu Asn Val Asn Ser Asp Ala Ser

330 335 340

gtg ccg atc cag aac aac aac cca atg aac tac ttc tcc aac gct aac 1290

Val Pro Ile Gln Asn Asn Asn Pro Met Asn Tyr Phe Ser Asn Ala Asn

345 350 355 360

aat gcc ggt gtt aac agc ttc atg cac cag gtt tct cca gcg ttc cag 1338

Asn Ala Gly Val Asn Ser Phe Met His Gln Val Ser Pro Ala Phe Gln

6 / 5 2

365

370

375

att gtg gat tct gtc gag aag att gac cca aca gat cca gtg cag ctg 1386

Ile Val Asp Ser Val Glu Lys Ile Asp Pro Thr Asp Pro Val Gln Leu

380

385

390

cag cag caa cag atg gcg agc ttg cag cat ctt cag aat aga gct tgt 1434

Gln Gln Gln Gln Met Ala Ser Leu Gln His Leu Gln Asn Arg Ala Cys

395

400

405

ggc ggc ggc gca agt tcg aat gaa tat aca gca tgg gga tcg tct ctg 1482

Gly Gly Gly Ala Ser Ser Asn Glu Tyr Thr Ala Trp Gly Ser Ser Leu

410

415

420

atg gat gca aat gag ctt gtc aac atg gag ctt cag tagtaggagc 1528

Met Asp Ala Asn Glu Leu Val Asn Met Glu Leu Gln

425

430

435

atatacctaac aacatgatga gagcatttgg aggtgcaaatt ttgcaacctg caaatgctgt 1588

ttttagtag tagttgttgc cgctgttttt gtctgaaact gtagtttcta tggattttgg 1648

acttgctgag gaacatctgc ggctgttggt gtttcaaatt gagaaaatga gggacaatgg 1708

gacatggtgg tctcccttaa tatagcgaaa aaatggttgg ata

1742

7 / 5 2

<210> 2

<211> 436

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Glu His Val Phe Ala Val Asp Glu Ile Pro Asp Pro Leu Trp Ala

1

5

10

15

Pro Pro Pro Pro Val Gln Pro Ala Ala Ala Ala Gly Val Asp Asp Val

20

25

30

Gly Ala Val Ser Gly Gly Gly Leu Leu Glu Arg Cys Pro Ser Gly Trp

35

40

45

Asn Leu Glu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Asp Gly Val Pro Ala Pro Ala

50

55

60

Ala Ser Pro Asp Gly Ala Ala Ile Tyr Pro Ser Pro Met Pro Ala Ala

65

70

75

80

Ala Ala Glu Ala Ala Ala Arg Trp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Arg Glu

85

90

95

Ala Val Gly Val Met Pro Met Pro Ala Ala Ala Leu Pro Ala Ala Pro

8 / 5 2

100

105

110

Ala Ser Ala Ala Met Asp Pro Val Glu Tyr Asn Ala Met Leu Lys Arg

115

120

125

Lys Leu Asp Glu Asp Leu Ala Thr Val Ala Met Trp Arg Ala Ser Gly

130

135

140

Ala Ile His Ser Glu Ser Pro Leu Gly Asn Lys Thr Ser Leu Ser Ile

145

150

155

160

Val Gly Ser Ile Leu Ser Ser Gln Lys Cys Ile Glu Gly Asn Gly Ile

165

170

175

Leu Val Gln Thr Lys Leu Ser Pro Gly Pro Asn Gly Gly Ser Gly Pro

180

185

190

Tyr Val Asn Gln Asn Thr Asp Ala His Ala Lys Gln Ala Thr Ser Gly

195

200

205

Ser Ser Arg Glu Pro Ser Pro Ser Glu Asp Asp Asp Met Glu Gly Asp

210

215

220

Ala Glu Ala Met Gly Asn Met Ile Leu Asp Glu Glu Asp Lys Val Lys

225

230

235

240

9 / 5 2

Lys Arg Lys Glu Ser Asn Arg Glu Ser Ala Arg Arg Ser Arg Ser Arg

245

250

255

Lys Ala Ala Arg Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gln Val Ser Leu Leu Arg

260

265

270

Val Glu Asn Ser Ser Leu Leu Arg Arg Leu Ala Asp Ala Asn Gln Lys

275

280

285

Tyr Ser Ala Ala Ala Ile Asp Asn Arg Val Leu Met Ala Asp Ile Glu

290

295

300

Ala Leu Arg Ala Lys Val Arg Met Ala Glu Glu Ser Val Lys Met Val

305

310

315

320

Thr Gly Ala Arg Gln Leu His Gln Ala Ile Pro Asp Met Gln Ser Pro

325

330

335

Leu Asn Val Asn Ser Asp Ala Ser Val Pro Ile Gln Asn Asn Asn Pro

340

345

350

Met Asn Tyr Phe Ser Asn Ala Asn Asn Ala Gly Val Asn Ser Phe Met

355

360

365

His Gln Val Ser Pro Ala Phe Gln Ile Val Asp Ser Val Glu Lys Ile

370

375

380

1 0 / 5 2

Asp Pro Thr Asp Pro Val Gln Leu Gln Gln Gln Gln Met Ala Ser Leu

385

390

395

400

Gln His Leu Gln Asn Arg Ala Cys Gly Gly Gly Ala Ser Ser Asn Glu

405

410

415

Tyr Thr Ala Trp Gly Ser Ser Leu Met Asp Ala Asn Glu Leu Val Asn

420

425

430

Met Glu Leu Gln

435

<210> 3

<211> 6335

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 3

tgctccattg cgctctcgga cgagcatata tgtatgacat gtgggcccg aatgtcagta 60

acaggaatc ctgaaaaaaa tgcagctatg tgataat ttt caacgtaat gttgcagttt 120

tctgaaaagt gtcgcaaagg ttgcagcaaa gtgatagttt agtcaataaa actgcagttt 180

11 / 52

tctgaaatTT actctagttt ttttacctat ctagttgggtt ttatgtgtaa ctaaaccetta 240

catcagatca aaacaagttt ataaattcac cacgtatttc cctcagctca catctttctg 300

agaacatgat aaattcatta cattgtgcta caccatatgg ggactttaga acatgttcgt 360

cttctttttt tttctttttt cttttttaca ttttaccttc tcagttttaca aatacttggt 420

agctttgcct ggatatgtaa cccaacacta tgatacaaat tttgtcaatt ctctaaaatt 480

tttcaagttt gaaacaaatt aagatgtatg gttgtgggtg aattaatcta cattgatagg 540

aatgcgtta aagtacatgc aaagcttatg aaattattgc aagtagtcat catgcctcag 600

tgagtcagtg tgcatacttg tagtgcataa ccaaattctt tttcatatac tagaaagatt 660

caaagctgca aatgtgcatg tgaggttgat gaatggaata cacaataata catgacaata 720

aacacatatt aaagaattta gtgcaaaaaa attgtattgt catggtacac attttaacaa 780

ttttctttac tttttataca ttgtaaatat taattaatat ctaaaacaaa atataaagta 840

cggaataaaa atttaattgg ctaatgtgga aatggcatgg agctaaatgt tctatatatg 900

gtcctaacgt ttaaagataa aatacatatg tgcttgtgtt actaataata tctaaaagac 960

1 2 / 5 2

taagtagtat gtattaaata tgctagagaa cataagaaac ttaaaaactt gacgtggcaa 1020

aatggggegct taagegacac atattgcact ttcagctgat cttattcccc cttttaaatt 1080

tcatgtcccc attttgatta tcacatggaa tcaaccacat tatacctatg catccttgtg 1140

atttctgaaa ttaaaactga aagcaaccaa gtaaagagga gggggagaaa aagttagcag 1200

aaaacatgga tgatacatgt caataagctg ctagcataac cataagtgtg gggcacgttt 1260

cttaggacaa tgggtataaag ttacaaactg aaatatcatt gttaggtcag tttgatataa 1320

tcagtttggg ttactataga cacttgtcat agtaaataga gatggatcat ttcttaagta 1380

gcacactac tcttattcac gaatgtcttt gctacccttt ctgttatact tttcctcttt 1440

ttctgtagaa agccatttgt ccttatatta tcattgtcaa attaaggatg cgtaatctac 1500

accctcactc aaaaactttg ataagataaa aacaaataaa tccatgcctt tatagaacct 1560

tgtcaaaatt atgctacacc tgtgctagga acaccatacc atcgtagctt acttgcacgc 1620

tttctgttag ccctttttcc taataaaaac gtattcgctc gtatcggttg tatcgcttg 1680

atcggtggg tttcacttta tatccgttga aacctctgtt aacacgtcca aattatttat 1740

1 3 / 5 2

atcgggtatta tcactcaaga tcgtgcgggt tgttttgctt tttaacgtttc ttgaagcttc 1800

taaagagggg acaaacctat ataaatagga gaggagagca ccctctcaac tcagttcaaa 1860

attgaaaaaa aaaagaaaaa aaaagagaag aaaaaaaaaac ccatgggttg cgtagccgta 1920

gctttccac catttccttc tctccgaagc ctctctctct ccgttctctc ccgcgaaacc 1980

aaattccaaa gcatttgatc gaatttctcc caaacttttc cagcgttttc aatttcgccc 2040

cgatttcggt tcgaaaaccc ctgcgaatt catttcaaac tcgtccgaga gcgcaatgga 2100

gcacgtgttc gccgtcgacg agatccccga cccgtgtggt gctccgccgc gcccggtgca 2160

gccggcggcg gccgccggag tagatgacgt cggcgcggtg agcggcggcg ggttgctgga 2220

gcggtgcccc tcgggggtgga acctcgagag gtttctggag gagctcgacg gcgtccctgc 2280

accggcggcg agcccggacg gcgcggcgat ttaccctagc ccgatgccgg cggcggcggc 2340

ggaggcggcg gcgcgctgga gtaggggcta cggcgatcgt gaggcggtgg ggtgatgcc 2400

catgcccgcg gccgcgttc cggcggcgcc ggcgagcgcg gcgatggacc ccgtggagta 2460

caacgcgatg ctgaagcgga agctggacga ggacctcgcc accgtcgcca tgtggagggt 2520

1 4 / 5 2

actctctctc atctcgatcg ctgcttgctt tgcttgcttc atggcttgta cagttgtact 2580

ggtgggttca ccatttgggg tgggtgtgat gggatggctg tggcgtaatt aagtgcatt 2640

tttagggcat ttctgtgat taactgtggc tagatggcg caatttagca tagatgtgac 2700

atatactagc tgttactatg aatctggacc ggctctctgt ccagattcat agtactagat 2760

gtgtcacatc cctctaaatc tcttatatta taaggaggga gtataaatta attttataag 2820

agcacgcgtt gatgtcgata tccgcacgt aagcccaggc actactcacg tgtgtgcttt 2880

cttatccata ctttaatat gtcagagtgg gatgagacaa actttaatat tgcgggggtg 2940

tgggtataata tttatattat ttccgtgtat agatttagga gtaatatgga ttaggattgc 3000

atggaggtgc agagacttta tgtgacttct tggagccgtg cattgcttga gtgcaaagtt 3060

aacaatttgg ttacatgttg caaaaatgat gtatagatca taggtcattg cacttatatt 3120

gggtggtcct aggcggtatg attcatggaa tatttttttg aaattctgta tttaccata 3180

tttgcatcac ttttcttatt attgttgttt gaaggaatta ttaggtcaca tacccttga 3240

agatgaaatt attttagtag aaaaaaagaa actgttatat tggaatctgg taaatttga 3300

1 5 / 5 2

cctagaaatt ctcaccagtc gattgtagat ggggaagcag agctttcttt ttagagattt 3360

gctccgctcc aacaaaaagt acctcgaggt actggtacct catggtacca aatcgtttcc 3420

gatcgttgga tctaacaatg cacatcctgc ctaattagat ccaacgatcg aaaatgattt 3480

ggtaccgtga ggtaccggtg cctcgaggta ctttttggtg gaccggagaa aatatcttct 3540

ttttatgtta gttttctaag tggggtatat aatttttgca attggatata atactttgaa 3600

ctcattatgt gggttcagtt tacaaatgac tacagaacat gttgatctga gcttttgcta 3660

gttgatttca gtttacaatg tgaaacggtt ccctatataa gattataatg ccattagaac 3720

taattaacta tgagagtgtg tgtttagctc cgatagttat taagtccctt tgcattctga 3780

cttcaatttt tggcatgtcc atccatccac aggctctgg tgcaatacat tctgagagtc 3840

ctctaggcaa taaaacatca ctgagtatag ttggttccat cctgagttca cagaagtgca 3900

ttgaaggtaa tctattatgc atatgtgctt agttaaatct tctcagtacc tatgagttat 3960

gacttatgag taatctctaa tgttgtaagc aaatctaatt ttgcgtaat gtagttttca 4020

tattatatat atctgattgg attttcccc tatttcgaca cattcaggta acgggatact 4080

1 6 / 5 2

agtgcagacc aagttaagtc ctggcccaaa tggaggatca ggcccatatg taaatcaaaa 4140

tacagatgct catgccaagc aagctacgag tggttcctca agggagccat caccatcaga 4200

ggatgatgat atggaaggag atgcagagc aatgggaaat atgaccttg atgaagaaga 4260

taaagtgaag aaaaggtaat atgtattctt ttgcttggtg atttttatctt ttcaattcaa 4320

cacatacaaa gagtaaacac tgagcattag cattagaaat taggggactt ttacatctat 4380

tgatttcctt ttttcttaga aatagctttt aagtaatatg ctttagatta tcaagataat 4440

ggatccttag tttctttcta ggtgtttcat gtttgtagtg gatgtatttg attatataca 4500

acattctcac tttttctta gaaatgcttg agctaagct tgctaggtg ttcaatgctt 4560

tatatacctg actgaatttt ggtaatgctt gttacaagct ggtgcattaa ggataattat 4620

tgtttcctg caagcagcta ttcatgcaaa aaaggaaaaa tgcaacgtgt atgattagaa 4680

caatttagga ggcatttgct tcttgctttt cataacatgc tgggaatate atgtcctgtt 4740

gtgtctagtt gctttttcta catatgaaaa attgagtta tctactgtgg tctttttttc 4800

cgcagcagtc agacattcat gtcgcctttt tttgtgtaat aaatacagcc ggatatttga 4860

17/52

gatttgagct tgtgttcttg tccaatttca ggaaggaatc caaccgggag tcagctagac 4920

gctcaagaag cagaaaggca gctcgcctaa aagacctgga ggagcaggtt ttgtgtttta 4980

cactattcca ttgactgca caacaaagtt ttggaatatg taagtaacaa gtgtaattgt 5040

tgctaaatca ttgcaggtat cactattaag ggttgaaaac tcttctctgt tgaggcgtct 5100

tgctgatgca aatcagaagt acagtgctgc tgctattgac aatagggtac taatggcaga 5160

cattgaagcc ctaagagcaa aggtatgcaa ctgtttaagt gccttttagt cctctgtatg 5220

aactgaacct ctctttcaaa taggtatcca attatccatg tgcattgatt ctggtcagta 5280

ttgtgcatct ttcattggtg agaaaaccgg aatattctac atatcaaaca tataccaaat 5340

tttcttgga tgaacgaac ttctagcatt tgttcttaaa atttggta ggaatattg 5400

caaatgttgt cctcttgctc cattcgaagg attaagttgt ttgcatcta ttataacctg 5460

caacaattag actcacttgt ttgtcttga aacaaccggg tgtaactact tttcttttct 5520

ctgcaacgta ccaggtgtaa ataatcgctt gccgaatggt gataaccaat tcacacaatg 5580

gatcacaatc aattttaaca aagaacctga gctacactac actactgcgg tgcgtatct 5640

1 8 / 5 2

tatagccata tgcttctaga ccacaactga aaattcatga accatgcgat gtgggttagc 5700

taacatcttg acatgattgc aggtgaggat ggcagaggag agtgtgaaga tggttacagg 5760

ggctagacaa cttcaccagg ccattcctga catgcaatct cccctcaatg tcaactctga 5820

tgcttctgtg ccgatccaga acaacaaccc aatgaactac ttctccaacg ctaacaatgc 5880

cgggtgtaac agcttcatgc accaggtttc tccagcgttc cagattgtgg attctgtcga 5940

gaagattgac ccaacagatc cagtgcagct gcagcagcaa cagatggcga gcttcagca 6000

tcttcagaat agagcttgtg gtggcggcgc aagttcgaat gaatatacag catggggatc 6060

gtctctgatg gatgcaaag agcttgtcaa catggagctt cagtagtagg agcatatcct 6120

aacaacatga tgagagcatt tggaggtgca aatttgcaac ctgcaaagtc tgttttgtag 6180

tagtagttgt tgtcgctgtt tttgtctgaa actgtagttt ctatggattt tggacttgct 6240

gaggaacatc tgcggtgtgt gttgtttcaa attgagaaaa tgagggacaa tgggacatgg 6300

tggtctccct taatatagcg aaaaatggtt ggaat 6335

1 9 / 5 2

<211> 1199

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (171)..(1004)

<400> 4

ggcacgaggc gatcaacaca aaaagcttct ctttcccttc tcctcctcgg tgatctgtct 60

cgccggggca tctcgaaaag catccgactc cgacgccgcc gcgcgccacc acccggccga 120

tcgccgacgc cgcagccgct ggaagcagca gggacgacgg agaatcggag atg gac 176

Met Asp

1

atc gag gcg ttc atc cac ggc gga agc ggg ggc ggc gac gcc gac gcc 224

Ile Glu Ala Phe Ile His Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ala Asp Ala

5

10

15

gac cac ccg ctc ggc atc ttc tcc gcc gcc gac ctc tcc ggc ttc ggc 272

Asp His Pro Leu Gly Ile Phe Ser Ala Ala Asp Leu Ser Gly Phe Gly

20

25

30

ttc gcg gac tcg agc acc atc aca ggg ggc att ccc aat cac ata tgg 320

20 / 52

Phe Ala Asp Ser Ser Thr Ile Thr Gly Gly Ile Pro Asn His Ile Trp

35 40 45 50

ccc cag tcc cag aac ctg aac gca cgg cat cct gcg gtc tcc acg aca 368

Pro Gln Ser Gln Asn Leu Asn Ala Arg His Pro Ala Val Ser Thr Thr

55 60 65

att gag tcg cag tca tca atc tgt gca gca gca agt ccc aca tca gct 416

Ile Glu Ser Gln Ser Ser Ile Cys Ala Ala Ala Ser Pro Thr Ser Ala

70 75 80

acc aat ctg aac atg aag gag agc caa act ctg gga ggc aca agt ggt 464

Thr Asn Leu Asn Met Lys Glu Ser Gln Thr Leu Gly Gly Thr Ser Gly

85 90 95

tcg gat tct gaa agt gaa tcg ctg ttg gat ata gag ggt ggt cca tgc 512

Ser Asp Ser Glu Ser Glu Ser Leu Leu Asp Ile Glu Gly Gly Pro Cys

100 105 110

gaa caa agc acg aac ccg ttg gac gtg aag aga gtg aga agg atg gtg 560

Glu Gln Ser Thr Asn Pro Leu Asp Val Lys Arg Val Arg Arg Met Val

115 120 125 130

tcc aat cgg gag tct gct cgg cga tcg agg aag aga aag caa gct cac 608

Ser Asn Arg Glu Ser Ala Arg Arg Ser Arg Lys Arg Lys Gln Ala His

135 140 145

21 / 52

tta gct gat ctc gag tca cag gtt gac cag ctc cgg ggc gaa aac gca 656

Leu Ala Asp Leu Glu Ser Gln Val Asp Gln Leu Arg Gly Glu Asn Ala

150

155

160

tcg ctt ttc aag cag ttg acg gat gcc aac cag caa ttc aca act tet 704

Ser Leu Phe Lys Gln Leu Thr Asp Ala Asn Gln Gln Phe Thr Thr Ser

165

170

175

gtc acg gac aac aga atc ctc aaa tca gac gtt gag gcc ctc cgg gtc 752

Val Thr Asp Asn Arg Ile Leu Lys Ser Asp Val Glu Ala Leu Arg Val

180

185

190

aag gtg aag atg gcg gag gac atg gtg gcg cgg ggg gcg ctg tcg tgc 800

Lys Val Lys Met Ala Glu Asp Met Val Ala Arg Gly Ala Leu Ser Cys

195

200

205

210

ggg ctc ggc cac ctg ggc ggg ctg tcg ccg gcg ctg aac ccc cgg cag 848

Gly Leu Gly His Leu Gly Gly Leu Ser Pro Ala Leu Asn Pro Arg Gln

215

220

225

gcg tgc cgc gtc ccc gac gtg ctc gcc ggc ctg gac tac gcc ggc gac 896

Ala Cys Arg Val Pro Asp Val Leu Ala Gly Leu Asp Tyr Ala Gly Asp

230

235

240

gac ccc ttc acg gcc ggg ctg tcc cag ccg gag cag ttg cag atg ccc 944

2 2 / 5 2

Asp Pro Phe Thr Ala Gly Leu Ser Gln Pro Glu Gln Leu Gln Met Pro

245

250

255

ggc ggc gag gtg gtt gac gcc tgg ggc tgg gac aac cac ccc aac ggc 992

Gly Gly Glu Val Val Asp Ala Trp Gly Trp Asp Asn His Pro Asn Gly

260

265

270

ggc atg tcc aag tgaaactact ggtcctactt ctatgtcagc tcagctacgt 1044

Gly Met Ser Lys

275

ttgaaacgtg atgtgtccaa gtgaacggac ttgagttttt cagagtcctc gtgtcgaagt 1104

gtcatgcact cttccctatt cctgtaatag aactgactag ctaagagact gaaagtctga 1164

aactacgaag tataaatgtg gtggaatttg gaact

1199

<210> 5

<211> 278

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 5

Met Asp Ile Glu Ala Phe Ile His Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ala

1

5

10

15

23/52

Asp Ala Asp His Pro Leu Gly Ile Phe Ser Ala Ala Asp Leu Ser Gly

20

25

30

Phe Gly Phe Ala Asp Ser Ser Thr Ile Thr Gly Gly Ile Pro Asn His

35

40

45

Ile Trp Pro Gln Ser Gln Asn Leu Asn Ala Arg His Pro Ala Val Ser

50

55

60

Thr Thr Ile Glu Ser Gln Ser Ser Ile Cys Ala Ala Ala Ser Pro Thr

65

70

75

80

Ser Ala Thr Asn Leu Asn Met Lys Glu Ser Gln Thr Leu Gly Gly Thr

85

90

95

Ser Gly Ser Asp Ser Glu Ser Glu Ser Leu Leu Asp Ile Glu Gly Gly

100

105

110

Pro Cys Glu Gln Ser Thr Asn Pro Leu Asp Val Lys Arg Val Arg Arg

115

120

125

Met Val Ser Asn Arg Glu Ser Ala Arg Arg Ser Arg Lys Arg Lys Gln

130

135

140

Ala His Leu Ala Asp Leu Glu Ser Gln Val Asp Gln Leu Arg Gly Glu

2 4 / 5 2

145 150 155 160

Asn Ala Ser Leu Phe Lys Gln Leu Thr Asp Ala Asn Gln Gln Phe Thr

165 170 175

Thr Ser Val Thr Asp Asn Arg Ile Leu Lys Ser Asp Val Glu Ala Leu

180 185 190

Arg Val Lys Val Lys Met Ala Glu Asp Met Val Ala Arg Gly Ala Leu

195 200 205

Ser Cys Gly Leu Gly His Leu Gly Gly Leu Ser Pro Ala Leu Asn Pro

210 215 220

Arg Gln Ala Cys Arg Val Pro Asp Val Leu Ala Gly Leu Asp Tyr Ala

225 230 235 240

Gly Asp Asp Pro Phe Thr Ala Gly Leu Ser Gln Pro Glu Gln Leu Gln

245 250 255

Met Pro Gly Gly Glu Val Val Asp Ala Trp Gly Trp Asp Asn His Pro

260 265 270

Asn Gly Gly Met Ser Lys

275

2 5 / 5 2

<210> 6

<211> 1362

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(907)

<400> 6

ggcagaggt cggaggaagg cg atg atg aag aag tgc ccg tcg gag ctg cag 52

Met Met Lys Lys Cys Pro Ser Glu Leu Gln

1

5

10

ctg gag gcg ttc atc cgg gag gag gcc gcc gcc gcc gac cgc aag ccc 100

Leu Glu Ala Phe Ile Arg Glu Glu Ala Gly Ala Gly Asp Arg Lys Pro

15

20

25

ggc gtg tta tct ccc gcc gac gcc gcg cgt aag tcc gcc ctg ttc tct 148

Gly Val Leu Ser Pro Gly Asp Gly Ala Arg Lys Ser Gly Leu Phe Ser

30

35

40

ccc gcc gac gcc gag atg tcc gtg ttg gat cag agt aca ctg gac gga 196

Pro Gly Asp Gly Glu Met Ser Val Leu Asp Gln Ser Thr Leu Asp Gly

45

50

55

26 / 52

agc ggc ggc ggc cac cag ctg tgg tgg ccg gag agc gtc cgt acg ccg 244

Ser Gly Gly Gly His Gln Leu Trp Trp Pro Glu Ser Val Arg Thr Pro

60

65

70

ccg cgc gcc gcc gcc gcc ttc tcg gcc acg gcc gac gag cgg acg ccg 292

Pro Arg Ala Ala Ala Ala Phe Ser Ala Thr Ala Asp Glu Arg Thr Pro

75

80

85

90

gcg tcc atc tcc gat gac ccc aaa cca acc acc tca gcg aac cac gcg 340

Ala Ser Ile Ser Asp Asp Pro Lys Pro Thr Thr Ser Ala Asn His Ala

95

100

105

cct gaa agc gac tcg gac tcc gat tgc gat tcg ctg tta gaa gca gag 388

Pro Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Cys Asp Ser Leu Leu Glu Ala Glu

110

115

120

agg agt cca cgc ctg cgt ggc acg aaa tcc aca gaa aca aag cga ata 436

Arg Ser Pro Arg Leu Arg Gly Thr Lys Ser Thr Glu Thr Lys Arg Ile

125

130

135

aga agg atg gtg tcc aac agg gag tcc gct cga cga tcc agg agg aga 484

Arg Arg Met Val Ser Asn Arg Glu Ser Ala Arg Arg Ser Arg Arg Arg

140

145

150

aag cag gca cag tta tct gaa ctc gaa tca cag gtc gag caa ctc aaa 532

27/52

Lys Gln Ala Gln Leu Ser Glu Leu Glu Ser Gln Val Glu Gln Leu Lys
 155 160 165 170

ggc gaa aac tca tcc ctc ttc aag cag ctc aca gag tcc agc cag cag 580
 Gly Glu Asn Ser Ser Leu Phe Lys Gln Leu Thr Glu Ser Ser Gln Gln
 175 180 185

ttc aat aca gcg gtc acg gac aac agg atc ctc aaa tcg gat gta gag 628
 Phe Asn Thr Ala Val Thr Asp Asn Arg Ile Leu Lys Ser Asp Val Glu
 190 195 200

gcc tta aga gtc aag gtc aag atg gct gaa gac atg gtc gcg agg gcc 676
 Ala Leu Arg Val Lys Val Lys Met Ala Glu Asp Met Val Ala Arg Ala
 205 210 215

gcg atg tcg tgt ggc ctg ggc cag ctc ggg ctg gcg cca ttg ctc agc 724
 Ala Met Ser Cys Gly Leu Gly Gln Leu Gly Leu Ala Pro Leu Leu Ser
 220 225 230

tcc agg aag atg tgc caa gct ttg gat atg ctc agt tta cca cgg aac 772
 Ser Arg Lys Met Cys Gln Ala Leu Asp Met Leu Ser Leu Pro Arg Asn
 235 240 245 250

gat gcc tgt ggt ttc aaa ggc ttg aac ctg ggt cga cag gtt cag aac 820
 Asp Ala Cys Gly Phe Lys Gly Leu Asn Leu Gly Arg Gln Val Gln Asn
 255 260 265

28 / 52

tca ccg gtt caa agc gct gca agc cta gag agc ctg gac aac cgg ata 868

Ser Pro Val Gln Ser Ala Ala Ser Leu Glu Ser Leu Asp Asn Arg Ile

270

275

280

tcc agc gag gtg acc agc tgc tcg gct gat gtg tgg cct taagacactt 917

Ser Ser Glu Val Thr Ser Cys Ser Ala Asp Val Trp Pro

285

290

295

catccgtgtt cgagagagct tgagattcta agaagcagcc ggtgagaatc tgaaaaggct 977

agttgttcag tttcctatatt ttagtttatg tttgaattct ctggctacta atgctcaaaa 1037

tctgggagag aatctaaatc gtttgggaca gataaaaaat tatgcgagaa ggtgtagctg 1097

acagaaacct tcccaaacaa atctccatca gaacctatat gtaaagtaat acggtatcct 1157

ctgttactag gtgcatgtgc ataactgaca agctgctaag tactaggtac tacagtctga 1217

ggcaagtatt tctggtgttt tgggtctgaa gaactatggt ttagtgcgtt tgatctgcgg 1277

caatcaaggc catctgatcg aaatttgatt ggtataaatc tgatcgaaat ttgattggta 1337

taagtataat agtttgattt tgate

1362

29 / 52

<210> 7

<211> 295

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 7

Met Met Lys Lys Cys Pro Ser Glu Leu Gln Leu Glu Ala Phe Ile Arg

1 5 10 15

Glu Glu Ala Gly Ala Gly Asp Arg Lys Pro Gly Val Leu Ser Pro Gly

20 25 30

Asp Gly Ala Arg Lys Ser Gly Leu Phe Ser Pro Gly Asp Gly Glu Met

35 40 45

Ser Val Leu Asp Gln Ser Thr Leu Asp Gly Ser Gly Gly Gly His Gln

50 55 60

Leu Trp Trp Pro Glu Ser Val Arg Thr Pro Pro Arg Ala Ala Ala Ala

65 70 75 80

Phe Ser Ala Thr Ala Asp Glu Arg Thr Pro Ala Ser Ile Ser Asp Asp

85 90 95

Pro Lys Pro Thr Thr Ser Ala Asn His Ala Pro Glu Ser Asp Ser Asp

100 105 110

30 / 52

Ser Asp Cys Asp Ser Leu Leu Glu Ala Glu Arg Ser Pro Arg Leu Arg

115

120

125

Gly Thr Lys Ser Thr Glu Thr Lys Arg Ile Arg Arg Met Val Ser Asn

130

135

140

Arg Glu Ser Ala Arg Arg Ser Arg Arg Arg Lys Gln Ala Gln Leu Ser

145

150

155

160

Glu Leu Glu Ser Gln Val Glu Gln Leu Lys Gly Glu Asn Ser Ser Leu

165

170

175

Phe Lys Gln Leu Thr Glu Ser Ser Gln Gln Phe Asn Thr Ala Val Thr

180

185

190

Asp Asn Arg Ile Leu Lys Ser Asp Val Glu Ala Leu Arg Val Lys Val

195

200

205

Lys Met Ala Glu Asp Met Val Ala Arg Ala Ala Met Ser Cys Gly Leu

210

215

220

Gly Gln Leu Gly Leu Ala Pro Leu Leu Ser Ser Arg Lys Met Cys Gln

225

230

235

240

Ala Leu Asp Met Leu Ser Leu Pro Arg Asn Asp Ala Cys Gly Phe Lys

3 1 / 5 2

245

250

255

Gly Leu Asn Leu Gly Arg Gln Val Gln Asn Ser Pro Val Gln Ser Ala

260

265

270

Ala Ser Leu Glu Ser Leu Asp Asn Arg Ile Ser Ser Glu Val Thr Ser

275

280

285

Cys Ser Ala Asp Val Trp Pro

290

295

<210> 8

<211> 12

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 8

gctgagtcac ga

12

<210> 9

<211> 12

<212> DNA

<213> Oryza sativa

3 2 / 5 2

<400> 9

catgagtcac tt

12

<210> 10

<211> 12

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 10

agtgagtcac tt

12

<210> 11

<211> 12

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 11

ggtgagtcac at

12

<210> 12

<211> 12

<212> DNA

<213> Oryza sativa

3 3 / 5 2

<400> 12

ggtgagtcac gt

12

<210> 13

<211> 12

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 13

gatgagtcac gc

12

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 14

aatgagtcac ca

12

<210> 15

<211> 12

<212> DNA

3 4 / 5 2

<213> Oryza sativa

<400> 15

agccacgtca ca

12

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<220>

<223> The 9th and 15th nucleotide residues are inosines.

<400> 16

tccaaymgng arwcngc

17

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

3 5 / 5 2

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

gtcctcygcc atcttcacct t

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

atgggttgcg tagccgtagc t

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

3 6 / 5 2

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

ttgcttggca tgagcatctg t

21

<210> 20

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

gaggatcagg cccatat

17

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

3 7 / 5 2

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

tcgctatatt aaggagacc a

21

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

tgctccattg cgctctcgga cgag

24

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

3 8 / 5 2

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

atgaattcgc gaggggtttt cga

23

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

gtttgggaga aattcgatca aatgc

25

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

39/52

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 25

atggtatggt gttcctagca caggtgtagc

30

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 26

aaaactgcag ttttctga

18

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

4 0 / 5 2

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 27

aatggatccg cgaggggttt tcgaa

25

<210> 28

<211> 12

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 28

gcttcctcat ga

12

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

4 1 / 5 2

<400> 29

aaccatggtg ctggagcggg gcccg

26

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 30

aaccatggcg gcggaggcgg cggcg

25

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

4 2 / 5 2

<400> 31

cccatggag tacaacgga tgc

23

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 32

aaccatggtt ggttccatcc tgagt

25

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

4 3 / 5 2

<400> 33

aaccatggct catgccaagc aagct

25

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 34

aaccatggat gaagaagata aagtgaag

28

<210> 35

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

4 4 / 5 2

<400> 35

taggatccgc tcctactact gaagct

26

<210> 36

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 36

aaggatccaa tggagcacgt gttcgcc

27

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

4 5 / 5 2

<400> 37

aaggatccgg cggcggaggc ggcgcg

26

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 38

gccggatcca gttggttcca tcctgag

27

<210> 39

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

4 6 / 5 2

<400> 39

aaggatcctg atgaagaaga taaagt

26

<210> 40

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 40

aaggatccag gagtagatga cgtcggc

27

<210> 41

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

47 / 52

<400> 41

aaggatccag acgagatccc cgacccgct

29

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 42

tagagctcta cgccgccggc atcgggct

28

<210> 43

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

4 8 / 5 2

<400> 43

tagagctcta aaggatcata tttcccat

28

<210> 44

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 44

tagagctcta ggcggccgcc gccggctg

28

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

4 9 / 5 2

<400> 45

tagagctcta cggcggcggc ggagccca

28

<210> 46

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 46

aaaccatgga gcacgtgttc gccgt

25

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

5 0 / 5 2

<400> 47

taggatccgc tcctactact gaagct

26

<210> 48

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 48

aaaccatgga gggagaagct gagacc

26

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

5 1 / 5 2

<400> 49

aaaggatcct acatatcaga agcggcggga

30

<210> 50

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 50

aaaccatgga tatagagggc ggtcca

26

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

5 2 / 5 2

<400> 51

aaaggatcct acagcccgcc caggtggccg

30

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 52

gtttgtcatg gctgagtcac g

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08936

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/29, C12N5/14, C07K14/415, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/29, C12N5/14, C07K14/415, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

Genbank/EMBL/EMBL/DDBJ/GeneSeq,

SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 10-14575 A (Mitsui Gyousai Shokubutsu Bio Kenkyusho K.K.), 20 January, 1998 (20.01.98) (Family: none)	1-3, 6, 8-16 4, 17-22
X Y	Nakase M, et al., Characterization of a novel rice bZIP protein which binds to the alpha-globulin promoter., Plant Mol. Biol. (1997), Vol.33, No.3, pp.513-522	1-3, 6 4, 8-22
X Y	Izawa T, et al., The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development., Plant Cell (1994), Vol.6, No.9, pp.1277-1287	1-3, 6 4, 8-22
X Y	Vincentz M, et al., ACGT and vicilin core sequences in a promoter domain required for seed-specific expression of a 2S storage protein gene are recognized by the opaque-2 regulatory protein., Plant Mol. Biol. (1997), Vol.34, No.6, pp.879-889	1-3, 6 4, 8-22
X Y	Weisshaar B, et al., Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness,	1-3, 6 4, 8-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
08 January, 2002 (08.01.02)Date of mailing of the international search report
22 January, 2002 (22.01.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08936

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	EMBO J. (1991), Vol.10, No.7, p.1777-1786	
Y A	Wu CY, et. al., The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants., Plant J. (1998), Vol.14, No.6, pp.673-683 Abstract	18-22 1-4,6,8-17
PX	Onodera Y, et. al., A rice functional transcriptional activator, RISBZ1, responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif., J. Biol. Chem. (April 2001), Vol.276, No.17, pp.14139-14152	1-4,6,8-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08936

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 5,7
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "DNA encoding an RNA having a ribozyme activity of specifically cleaving a transcription product of a DNA as claimed in any of claims 1 to 3" as set forth in claim 5 and the "DNA encoding a protein having a dominant negative characteristic to a protein encoded by a DNA as set forth in any of claims 1 to 3 intrinsic in plant cells" as set forth in claim 7, it is completely unknown what particular DNAs are involved in the scopes thereof and what are not. Thus, these claims are described in an unclear manner.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/29, C12N5/14, C07K14/415, A01H5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/29, C12N5/14, C07K14/415, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)
Genebank/EMBL/EMBL/DBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	JP 10-14575 A (株式会社三井物産植物バイオ研究所) 1998.01.20 ファミリーなし	<u>1-3, 6, 8-16</u> 4, 17-22
<u>X</u> Y	Nakase M, et. al., Characterization of a novel rice bZIP protein which binds to the alpha-globulin promoter., Plant Mol. Biol. (1997), Vol. 33, No. 3, p. 513-522	<u>1-3, 6</u> 4, 8-22
<u>X</u> Y	Izawa T, et. al., The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development., Plant Cell (1994), Vol. 6, No. 9, p. 1277-1287	<u>1-3, 6</u> 4, 8-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.01.02

国際調査報告の発送日

22.01.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Vincentz M, et.al., ACGT and vicilin core sequences in a promoter domain required for seed-specific expression of a 2S storage protein gene are recognized by the opaque-2 regulatory protein., Plant Mol. Biol. (1997) , Vol. 34, No. 6, p. 879-889	<u>1-3, 6</u> 4, 8-22
<u>X</u> Y	Weisshaar B, et.al., Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness., EMBO J. (1991), Vol. 10, No. 7, p. 1777-1786	<u>1-3, 6</u> 4, 8-22
<u>Y</u> A	Wu CY, et.al., The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants., Plant J. (1998), Vol. 14, No. 6, p. 673-683 Abstract 参照	<u>18-22</u> 1-4, 6, 8-17
P X	Onodera Y; et.al., A rice functional transcriptional activator, RISBZ1, responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif., J. Biol. Chem. (2001 Apr), Vol. 276, No. 17, p. 14139-14152	1-4, 6, 8-22

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 5, 7 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲5の「請求項1から3のいずれかに記載のDNAの転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA」、請求の範囲7の「植物細胞における内在性の請求項1から3のいずれかに記載のDNAがコードするタンパク質に対してドミナントネガティブの形質を有する蛋白質をコードするDNA」は、DNAとして具体的にどのDNAが包含され、どのようなDNAが包含されないのかが全く不明であり、請求の範囲の記載が不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。